

整理番号: 発送番号:143770 発送日:平成22年 3月 2日 1

弓用非牛寺言午文献

特許出願の番号

特願2004-550230

作成日

平成22年 2月19日

作成者

渕野 留香 4042 4P00

発明の名称

C型肝炎、牛ウイルス性下痢症及び豚コレラウイルスを含むラビウイルス科ウイルスにより生起される感染症の治療のためのエンドペルオキシド類の使用

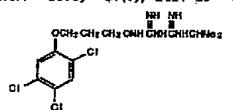
本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。
取扱にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

injections of candidate antiparasitic drugs, and antidotes for chemoparasites. Preliminary studies will be done to ascertain methods and dose ranges. All expts. incorporated the following physiol. methods: cardiovascular measures; arterial blood pressure, left ventricular pressure, dP/dt, left ventricular and diastolic pressures; ECG readings; PR intervals and QTc times; heart rate; pulmonary artery pressure, pulmonary wedge pressure and pulmonary vascular resistance; pulmonary ventilatory measures; air flow transpulmonary pressure; tidal vol., minute vol., compliance, resistance and respiratory rate; and Hematol. Measures: pO₂, pCO₂, pH and microhematocrit.

119: 173659a Epileptogenic effect of antibiotic drugs. Grøndahl, Tor O.; Langmoen, Iver A. [Inst. Surg. Res. National Hospital, Univ. Oslo, Oslo, Norway]. *J. Neurosurg.* 1993, 78(6), 938-43 (Eng). The epileptogenicity of antibiotic drugs represents a clinical problem, and it is well known that the use of penicillin and certain other preps. can induce seizures. In the present study, the authors investigated the epileptogenic properties of different concns. of 12 commonly used antibiotic medication belonging to seven sep. groups. The drugs were tested in the hippocampus, which has a low threshold for the development of epileptiform activity. The hippocampal slice technique, using rat tissue, was employed since absence of the blood-brain barrier allows administration of the drug in known concns. The prep. was exposed to antibiotics in known concns. and the amplitude and no. of population spikes were recorded. Penicillin G was used as a ref. substance. Cloradilin (≥ 1 g/L), cephalothin (≥ 1 g/L), gentamicin (≥ 20 mg/L), chloramphenicol (≥ 1 g/L), ciprofloxacin (≥ 50 mg/L), erythromycin (≥ 1 g/L), and ampicillin (≥ 1 g/L) showed moderate to marked epileptogenic effects, whereas ceftazidime, clindamycin, cefotaxime, vancomycin, and tobramycin had no epileptogenic effects.

119: 173660a Synthesis of a series of 5-nitro-(benzimidazoles and indoles) as novel antimycotics and evaluation as genotoxins in the Ames test. Freita, Patrizia; Moretti, Maria; Vignati, Fernanda; Burnelli, Silvia; Garuti, Laura; Sabatino, Piero; Cantelli-Porti, Giorgio [Dep. Pharmacol., Univ. Bologna, Bologna, Italy]. *Mutagenesis* 1993, 8(6), 183-8 (Eng). Nitrobenzimidazole and nitroindole derivs. related to oximeprazole and characterized by mutagenicity, have been synthesized as novel antimycotics and their mutagenic properties tested in *Salmonella typhimurium* strains TA100 and TA98 with and without endogenous metabolizing system. TA98NR and TA98/1,5-DNP strains were employed to identify a specific metabolic reaction which governs the mutagenicity potency. Active compds. are weak direct-acting mutagens. Only derive. bearing a nitro group on the Ph ring linked to the oximino function and lacking halogenated substituents show mutagenic activity. Metab. by bacterial enzyme systems is important to the expression of genotoxicity. The reductive activation of nitrobenzimidazoles and nitroindoles carried out by the 'classical' nitroreductase of *Salmonella*, which is defective in TA98/1,5-DNP, is required for mutagenicity. Similarly, the O-acetyltransferase defective in TA98/1,5-DNP is required for the efficient prodn. of the ultimate electrophilic nitrogen species, which react with DNA. The role of bacterial metab. in mutation induction needs careful consideration to assess the potential risk to humans from nitrobenzimidazole and nitroindole antimycotics.

119: 173661a Anti-Pneumocystis carinii activity of PS-16, a new biguanide folate antagonist. Hughes, Walter T.; Jacobus, David F.; Canfield, Craig; Killmer, John [Dep. Infect. Dis., St. Jude Child. Res. Hosp., Memphis, TN 38103 USA]. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993, 37(7), 1417-19 (Eng). A newly



synthesized biguanide inhibitor of dihydrofolate reductase in *Plasmodium* species was evaluated for its anti-Pneumocystis carinii activity. The compd. (I), designated PS-16, was administered prophylactically and therapeutically to immunosuppressed rats latently infected with *P. carinii*. Doses of 5 and 25 mg of I per kg of body wt. per day given orally during 7 wk of dermethazine immunosuppression prevented *P. carinii* infection in all (100%) 19 rats given the drug, while 8 or 9 (67%) untreated control rats developed *P. carinii* pneumonitis. A single weekly dose of 50 mg of I per kg also prevented the infection in all 10 rats. *P. carinii* pneumonitis was established after 4 wk of immunosuppression, and was then treated orally for 3 wk with 25, 5, and 1 mg of I per kg/day. Complete resolu. of the infection occurred in all (100%) 10 rats given 25 mg of I, 6 of 9 (67%) rats given 5 mg of I, and 6 or 8 (75%) rats given 1.0 mg of I per kg per day and in all (100%) 9 rats treated with trimethoprim-sulfamethoxazole. I was well tolerated at all doses. Because drug studies in the *P. carinii* rat model have been highly predictable of the effects of drugs on the disease in humans, these expts. suggest that I may have promise as a drug for the treatment of *P. carinii* pneumonitis in humans.

119: 173662a Potent inhibition of Epstein-Barr virus by phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides without sequence recognition. Yao, Gang-Sing; Grill, Susan; Egan, William; Cheng, Yung-Chi [Sch. Med., Yale Univ., New Haven, CT 06510 USA]. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993, 37(7), 1420-5 (Eng). The authors found that 23-mer phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides (S-oligos) with and without sequence specificity complementary to

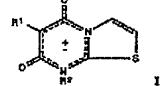
Epstein-Barr virus (EBV) genes are potent inhibitors of EBV replication in cell culture. The decrease in the amt. of EBV DNA, the activity of intracellular viral DNA polymerase, and viral prodn. were dose-dependent with a 90% ID of approx. 0.5 μ M. No inhibition of cell growth was obsd. with the S-oligos at concns. up to 20 μ M. The mechanism of action appears to be the inhibition of EBV DNA synthesis. The durability of anti-EBV action is dependent on the dose and the duration of drug exposure. S-oligos should be considered a new class of anti-EBV agents.

119: 173663a Experimental study of inhibitory effect of the four traditional Chinese herb medicines on epidemic hemorrhagic fever virus. Zhang, Xianhong; Tang, Xiangpeng; Su, Xianlin [2nd Affil. Hosp., Hunan Med. Univ., Changsha, P.R. of China]. *Huan Yiexue Daxue Xuebao* 1992, 18(2), 165-7 (Ch). A lab. observation of inhibitory effect of artemether, glycyrrhizin, houttuynia and bupleura on epidemic hemorrhagic fever virus (EHFV) infection is reported. The infection rates of the suckling mice treated with artemether and glycyrrhizin were much lower than that in the control group. The distribution of EHFV in the suckling mice on houttuynia and bupleura was different from that in the control group. It is indicated that artemether and glycyrrhizin can markedly prevent the EHFV infection in suckling mice. Moreover, houttuynia and bupleura might inhibit EHFV infection to some extent.

119: 173664a A morphological study of the effects of liposomal albezonazole on the muscle phase of *Trichinella spiralis* in mice. Hrckova, G.; Velicky, S.; Horak, J. [Helmintol. Inst., Slovak Acad. Sci., 040 01 Kosice, Czech]. *J. Helminto.* 1993, 67(1), 24-30 (Eng). The pathomorphol. effects of daily and weekly doses of liposomal albezonazole on *Trichinella spiralis* larvae have been examd. and compared during the course of muscle infections in mice. Treatment with three and six daily doses of the drug given by i.p. injection to mice resulted in marked pathol. alterations to encapsulated larvae, mainly in the walls of the capsules. There was a 5% efficacy against *T. spiralis* in mice given three daily doses of albezonazole, and 38% efficacy in mice given six daily doses of the drug. The same doses of drug, when administered weekly, did not reduce the no. of parasite larvae, and the application of drug at 6-weekly intervals resulted in a 5% reduction, in no.

119: 173665a In vitro and *in vivo* bactericidal activities of cephalins against *Escherichia coli* in a mixed system with strains possessing inducible β -lactamases. Araki, Harumi; Okamoto, Minoru; Minami, Shunoburo; Yasuda, Takeaki; Watanabe, Yutaka [Res. Lab., Toyama Chem. Co., Ltd., Toyama, Japan]. *Chemotherapy* (Tokyo) 1992, 41(7), 755-64 (Japan). In vitro and *in vivo* bactericidal activities of five cephalins (cefazolin (CEZ), cefotin (CTM), cefazime (CMZ), cefotaxime (CTX), and cephazolin (CPZ)) against *Escherichia coli* TK-16R (a non- β -lactamase-producing strain) were studied in a mixed system with strains possessing inducible β -lactamases (*Enterobacter cloacae* H-27, *Proteus vulgaris* T-178, *Morganella morganii* T-211, *Providencia rettgeri* GN4420, and *Serratia marcescens* W-24). In mixed cultures with strains possessing inducible β -lactamases, CEZ and CTM showed lower bactericidal activity against *E. coli* than that in pure cultures of *E. coli*. The bactericidal activity of CMZ was reduced in mixed cultures except for *P. vulgaris*. CTX was more active in mixed cultures than CEZ, CTM, or CMZ, but *E. coli* regrew in the presence of CTX in mixed cultures except for *S. marcescens*. Among the five cephalins, CPZ was the most active agent in mixed cultures. In mixed infections of rat pouches caused by *E. coli* and *E. cloacae*, the bactericidal activity of CMZ against *E. coli* was reduced, whereas, CPZ acted bactericidally on *E. coli* in pure and mixed infections. In the β -lactamase inducibility tests, CMZ induced the largest amt. of enzyme among the five cephalins, followed by CTX, CTM and CEZ. In contrast to CMZ, CPZ caused little induction of β -lactamase prodn. in any of the strains tested. Against the majority of enzymes tested, CEZ and CTM showed the largest V_{max} and K_m values among the five cephalins, followed by CPZ. CMZ or CTX tended to show the lowest V_{max} and K_m (K_i) values. The V_{max}/K_m or K_i values of these five cephalins were similar, and the differences between them were larger than the differences between the V_{max} values. These results suggest that the amt. of β -lactamase induced by a cephalin and β -lactamase's liability of the cephalin (V_{max} and V_{max}/K_m or K_i values) were important factors influencing *in vitro* and *in vivo* redn. of bactericidal activity of the cephalin against *E. coli* in a mixed system with strains possessing inducible β -lactamases.

119: 173666a Effects of mescalonic xanthine analogs on *Trypanosoma musculi* development in mice. Sen, Dilip K.; Mhaisalkar, Godwin O.; Adson, Anthony [Dep. Life Sci., Virginia State Univ., Petersburg, VA 23806 USA]. *J. Eukaryotic Microbiol.* 1993, 40(3), 255-62 (Eng). Two derivs. of the mescalonic thiazolo[3,2-a]pyrimidine-5,7-diones I were prep'd. and examd. for in vivo antiprotozoan activity. Mescalonic compds. IA (R¹ = H, R² = p-ClC₆H₄) and IB (R¹ = CH₃, R² = CH₂CH₃) were inoculated into Swiss Webster male mice with *Trypanosoma musculi* infection. The effects were measured by studying parasite populations during the course of patent period (days 9 through 15 post-infection). The injection of



整理番号: 発送番号:143771 発送日:平成22年 3月 2日 1

弓用非牛寺言午文南

2

特許出願の番号 特願2004-550230
作成日 平成22年 2月19日
作成者 渕野 留香 4042 4P00
発明の名称 C型肝炎、牛ウイルス性下痢症及び豚コレラウイルスを含むフラビウイルス科ウイルスにより生起される感染症の治療のためのエンドペルオキシド類の使用

本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。
取扱にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。



Pergamon

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 4, No. 7, pp. 931-934, 1994
Copyright © 1994 Elsevier Science Ltd
Printed in Great Britain. All rights reserved
0960-894X/94 \$6.00+0.00

0960-894X(94)E0079-T

SYNTHESIS AND *IN VITRO* ANTI-HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS
ACTIVITY OF ARTEMISININ (QINGHAOSU)-RELATED TRIOXANES

Mankil Jung^{*a} and Raymond F. Schinazi^b

^aResearch Institute of Pharmaceutical Sciences & Department of Medicinal Chemistry,
School of Pharmacy, University of Mississippi, University, MS 38677

^bVeterans Affairs Medical Center & Department of Pediatrics,
Emory University School of Medicine, Decatur, GA 30033

Abstract: A series of artemisinin (qinghaosu)-related trioxanes has been prepared and assayed *in vitro* for anti-HIV activity. One of these compounds, 12-n-butyldeoxoartemisinin shows a good antiviral activity against HIV-1.

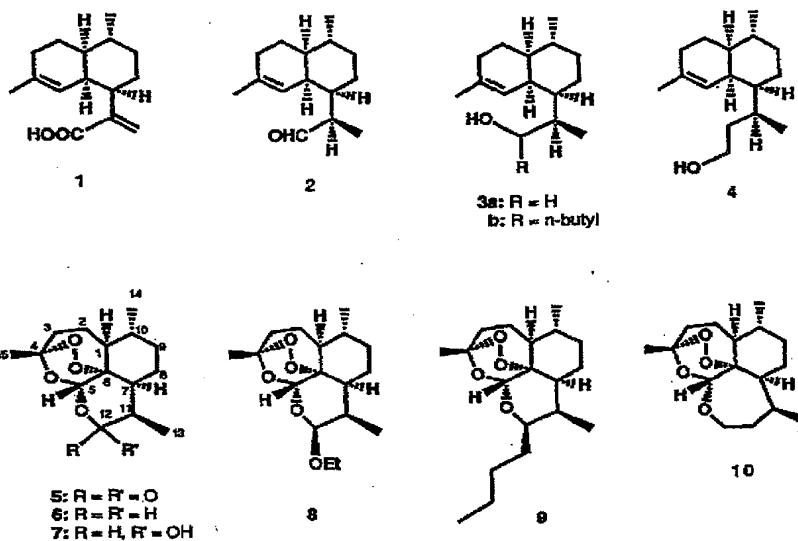
Artemisinin (Qinghaosu), 5, isolated from *Artemisia annua*, L., is a sesquiterpene lactone bearing an unusual cyclic peroxide function¹. This natural product is of special interest because of its outstanding anti-malarial activity^{2a}, *in vitro* activity against *Pneumocystis carinii*^{2b} and novel structures^{2a, c-d}. Unique endoperoxide within the molecule has prompted us to prepare artemisinin-related trioxanes and evaluate their *in vitro* anti-HIV activity. In this communication, we would like to report, for the first time, the structure-activity relationship of artemisinin derivatives.

A series of artemisinin-related compounds has been prepared from artemisinic acid, 1³⁻⁸. Thus, reduction of artemisinic acid, 1 with sodium borohydride (NaCl_2 , CH_3OH)⁹ to dihydroartemisinic acid, followed by photoxygenative cyclization and acidic treatment of photo adducts afforded artemisinin, 5 in 21 % yield. Direct reduction of artemisinin, 5 with NaBH_4 in the presence of $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ in THF afforded deoxoartemisinin, 6 in 75 % yield⁴. Compound 6 was also synthesized in 35 % yield via chiral photoxygenative cyclization as a penultimate step from dihydroartemisinyl alcohol 3a, prepared from artemisinic acid, 1⁵. Treatment of artemisinin, 5 with NaBH_4 in methanol (0°C , 1h., 89 % yield) to dihydroartemisinin 7 and subsequent etherification in ethanol under acidic catalysis ($\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$) in anhydrous benzene (reflux, 1h.) afforded β -arteether 8 according to the literature⁶. Reaction of dihydroartemisinyl aldehyde 2, prepared from 1 by a literature procedure⁷, with n-butylmagnesium chloride gave alcohol 3b. Aldehyde 2 was also used to prepare 4⁷. Photoxygenative cyclization, as previously mentioned, of 3b and 4 provided 12-n-butyldeoxoartemisinin 8⁸ and homodeoxoartemisinin 10⁷ in 12 % and 21 % yields, respectively. Compound 13 was prepared in 86 % yield from (R)-(+)3-methylcyclohexanone with (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride in the presence of phenyllithium in anhydrous ether

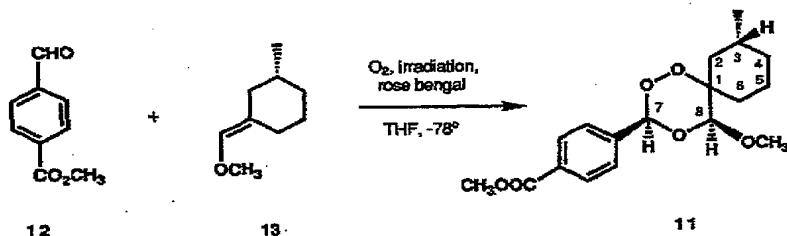
本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。
取扱にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

932

M. JUNG and R. F. SCHINAZI



Scheme 1



本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。
取扱にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

Anti-HIV activity of artemisinin-related trioxanes

993

(r.t., 15 h.). Chiral photoxygenative cyclization of **13** with **12** in the presence of oxygen (irradiation with 450 watts high pressure mercury arc lamp, 3 h., rose bengal as a sensitizer, -78 °C in THF) afforded trioxane **11**^{10,11} in 51 % yield (Scheme 1). The assignment of ¹H NMR and ¹³C NMR signals were made on the basis of 2D-COSY and HETCOR spectra of **11**. The relative configuration at the new chiral centers (C-7 and C-8) was unambiguously determined as depicted in **11** by utilization of two dimensional NOE (NOSEY) techniques. The anti-HIV activity of artemisinin and its related trioxanes was determined in human peripheral blood mononuclear (PBM) cells¹² acutely infected with HIV-1 LAI and presented in Table 1. Compounds **5**, **6**, and **11** do not exhibit any significant anti-HIV activity (EC_{50} >100 μM) while **8** and **10** show a moderate anti-HIV activity. **12-n-Butyldeoxoartemisinin** **9** shows a modest *in vitro* antiviral activity against HIV-1 LAI (EC_{50} = 4.7 μM) comparable to that of 2',3'-dideoxythymidine (AZT). However, this compound was toxic to human PBM cells with an IC_{50} value of 1.3 μM, suggesting that the antiviral effect could be secondary to the toxic effect. The mechanism of activity of artemisinin-related trioxanes against HIV is unknown. However, it is known that artemisinin and its derivatives act as free-radical generators¹³. We propose activated oxygen may mediate the anti-HIV activity of the trioxanes.

Table 1

Median Effective (EC_{50}) and Inhibitory (IC_{50}) Concentrations of Various Trioxanes in acutely HIV-1 infected PBM cells

Compound	EC_{50} (μM)	IC_{50} (μM) ^a
5	>100	>100
6	>100	>100
8	41.2	30.9
9	4.7	1.3
10	50.2	>100
11	>100	>100
AZT	0.004	>100

^aCytotoxicity was measured using ³H-thymidine uptake in human PBM cells.

In conclusion, we found **12-n-butyldeoxoartemisinin** possesses a modest anti-HIV activity. This is the first report on anti-HIV activity of artemisinin derivatives, although the compound is not selective against this virus. Artemisinin is virtually non-toxic (LD_{50} = 4228 mg/Kg orally administered to mice) and without carcinogenicity^{2a} suggesting that this class of compounds, and in particular **12-n-**

本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。
取扱にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

butyldideoxartemisinin deserves further evaluation as a potential antiviral agent for treatment of HIV infections, especially if non-toxic congeners can be synthesized.

Acknowledgments: The authors wish to thank Drs. Chung K. Chu, James McChesney, and Hala ElSohly for helpful discussions. The financial support of the Research Institute of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Mississippi is gratefully acknowledged. RFS is supported in part from National Institutes of Health grant (AI-25899). We also thank the Department of Veterans Affairs for supporting this work.

References and Notes

- For isolation of artemisinin, see a) Liu, J. M.; Ni, M. Y.; Fan, J. F.; Tu, Y. Y.; Wu, Z. H.; Wu, Y. L.; Zhou, W. S., *Acta Chim. Sin.*, 1979, 37, 129. b) Klayman, D. L.; Lin, A. J.; Acton, N.; Scoville, J. P.; Hoch, J. M.; Milhous, W. K.; Theocharides, A. D., *J. Nat. Prod.*, 1984, 47, 715. c) ElSohly, H. N.; Croam Jr., E. M.; ElFerally, F. S.; ElSherei, M. M., *ibid*, 1990, 53, 1560.
- a) Lu, X.-D.; Shen, C.-C., *Med. Res. Rev.*, 1987, 7, 29. b) Merall, S.; Meshnick, S. R., *Antimicro. Agents Chemother.*, 1991, 35, 1225. c) Zaman, S.; Sharma, R., *Heterocycles*, 1991, 32, 1593. d) Butler, A.; Wu, Y., *Chem. Soc. Rev.*, 1992, 85.
- Roth, R. J.; Acton, N., *J. Nat. Prod.*, 1989, 52, 1183.
- Jung, M.; Li, X.; Bustos, D. A.; ElSohly, H. N.; McChesney, J. D.; Milhous, W. K., *J. Med. Chem.*, 1990, 33, 1516.
- Jung, M.; Li, X.; Bustos, D. A.; ElSohly, H. N.; McChesney, J. D., *Tet. Lett.*, 1989, 30, 5973.
- a) Li, Y.; Yu, P. L.; Chen, Y. X.; Li, L. Q.; Gai, Y. Z.; Wang, D. S.; Zheng, Y. P., *Yaoxue Xuebao*, 1981, 16, 429. b) Brassi, A.; Venugopalan, B.; Gerpe, L. D.; Yeh, H. J. C.; Filppen-Anderson, J. L.; Buchs, P.; Luo, L. D.; Milhous, W.; Peters, W., *J. Med. Chem.*, 1988, 31, 645.
- Bustos, D. A.; Jung, M.; ElSohly, H. N.; McChesney, J. D., *Heterocycles*, 1989, 29, 2273.
- Jung, M.; Bustos, D. A.; ElSohly, H. N.; McChesney, J. D., *Synlett*, 1990, 743.
- Satoh, T.; Nanba, K.; Suzuki, S., *Chem. Pharm. Bull.*, 1971, 19, 817.
- Asveld, E. W. H.; Kellogg, R. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1930, 102, 3644.
- For 11: ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.05 and 7.62 (m, 4H, aromatic), 6.24 (s, 1H, 7-H), 4.65 (s, 1H, 8-H), 3.92 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.56 (s, 3H, OCH₃), 2.53-2.35 (m, 1H, 2-Hz), 2.05-1.85 (m, 1H, 3-H), 1.71-1.61 (m, 7H), 0.98 (d, J=9 Hz, 3H, CH₃ at C3). IR (CHCl₃): max 3005, 2960, 2850, 1720, 1620, 1440, 1280, 1120, 1070, 1050, 1020, 970, 910. MS (70 eV): m/e 336 (M⁺).
- For antiviral evaluation procedures, see Chu, C. K.; Ullas, G. V.; Jeong, L. S.; Ahn, S.K.; Doboszewski, B.; Lin, Z. X.; Beach, J. W.; Schinazi, R. F., *J. Med. Chem.*, 1990, 33, 1553.
- a) Meshnick, S. R.; Tsang, T. W.; Lin, F. B.; Pan, H.-Z.; Chang, C. N.; Kuypers, F.; Chiu, D.; Lubin, B., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1989, 188, 85. b) Meshnick, S. R.; Yang, Y.-Z.; Lima, V.; Kuypers, F.; Kamchonwongpaisan, S.; Yuthavong, Y., *Antimicro. Agents Chemother.*, 1993, 37, 1108.

(Received in USA 2 December 1993; accepted 4 March 1994)

PCT

世界知识产权组织
国际局

INT'L PCT

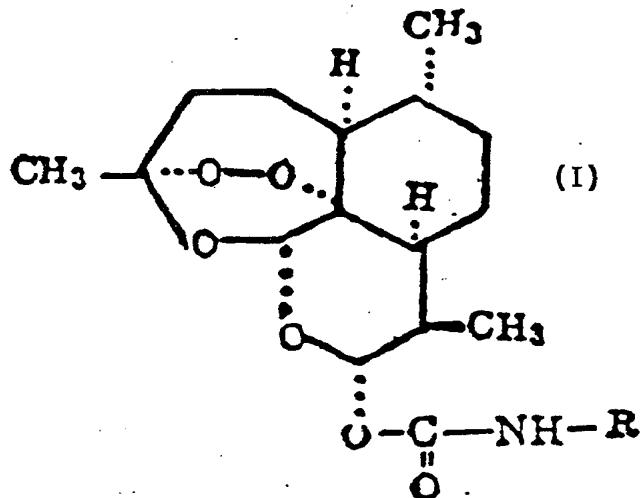


按照专利合作条约(PCT)所公布的国际申请

(51) 国际专利分类号 ⁵ :	A1	(11) 国际公布号:	WO95/03311
C07D 493/18		(43) 国际公布日:	1995年2月2日 (02.02.95)
(21) 国际申请号:	PCT/CN94/00056	(81) 指定国:	AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, ARIPO专利 (KE, MW, SD), 欧洲专利 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI专利 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
(22) 国际申请日:	1994年7月19日 (19.07.94)		
(30) 优先权:	93108651.5 1993年7月19日 (19.07.93) CN		
(71) (72) 申请人及发明人:	罗宣德(LUO, Xuande) [CN/CN]; 中国北京市朝外白家庄西里9楼3单元105号, 邮政编码: 100020, Beijing (CN)。李泽琳(LI, Zelin) [CN/CN]; 中国北京市东直门内中医研究院中药研究所, 邮政编码: 100700, Beijing (CN)。曾毅(ZENG, Yi) [CN/CN]; 中国北京市宣武区迎新街100号, 邮政编码: 100052, Beijing (CN)。马林(MA, Lin) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区雅宝路2号西门1401, 邮政编码: 100020, Beijing (CN)。		本国际公布: 包括国际检索报告。
(74) 代理人:	永新专利商标代理事务所北京办事处 (NTD PATENT & TRADEMARK AGENCY LIMITED, BEIJING OFFICE); 中国北京市德外北三环中路6号10层, 邮政编码: 100011, Beijing (CN)。		

(54) Title: QINGHAOSU DERIVATIVES AGAINST AIDS

(54) 发明名称: 抗艾滋病毒的青蒿素类药物

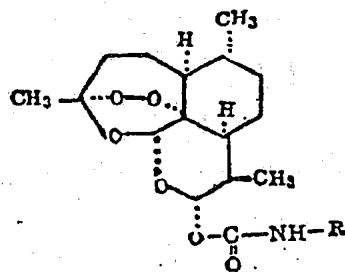


(57) Abstract

This invention relates to the compounds represented by general formula (I) and the processes for their preparation, wherein R is selected from C₁-C₄ alkyl, C₃-C₆ cycloalkyl, phenyl unsubstituted or substituted by a halogen atom or nitro group, biphenyl unsubstituted or substituted by a halogen atom or nitro group, naphthyl unsubstituted or substituted by a halogen atom or nitro group. The compounds of this invention are used to prepare agents for prevention and treatment of AIDS and drugs against malaria and toxoplasmosis.

(57) 摘要

本发明涉及一种以下列通式(I)表示的化合物及其制法,



其中, R为选自C₁-C₄的烷基、C₃-C₆的环烷基、卤代或硝基取代或未取代的苯基、卤代或硝基取代或未取代的联苯基、卤代或硝基取代或未取代的萘基。本发明之化合物可用于制备预防和治疗艾滋病药物,以及制备抗疟药物和抗弓形虫药物。

以下内容仅供参考

在按照PCT所公布的国际申请小册子首页上所采用的PCT成员国国家代码如下:

AM 亚美尼亚	CN 中国	JP 日本	MD 莫尔多瓦	SI 斯洛文尼亚
AT 奥地利	CZ 捷克共和国	KE 肯尼亚	MG 马达加斯加	SK 斯洛伐克
AU 澳大利亚	DE 德国	KG 吉尔吉斯斯坦	ML 马里	SN 塞内加尔
BB 巴巴多斯	DK 丹麦	坦	MN 蒙古	SZ 斯威士兰
BE 比利时	EE 爱沙尼亚	KP 朝鲜民主主义人民共和	MR 毛里塔尼亚	TD 乍得
BF 布基纳法索	ES 西班牙	国	MW 马拉维	TG 多哥
BG 保加利亚	FI 芬兰	KR 韩国	NE 尼日尔	TJ 塔吉克斯坦
BJ 贝宁	FR 法国	KZ 哈萨克斯坦	NL 荷兰	TT 特立尼达和
BR 巴西	GA 加蓬	LI 列支敦士登	NO 挪威	多巴哥
BY 白俄罗斯	GB 英国	LK 斯里兰卡	NZ 新西兰	UA 乌克兰
CA 加拿大	GE 格鲁吉亚	LR 利比里亚	PL 波兰	US 美国
CF 中非共和国	GN 几内亚	LT 立陶宛	PT 葡萄牙	UZ 乌兹别克斯
CG 刚果	GR 希腊	LU 卢森堡	RO 罗马尼亚	坦
CH 瑞士	HU 匈牙利	LV 拉脱维亚	RU 俄罗斯联邦	VN 越南
CI 科特迪瓦	IE 爱尔兰	MC 摩纳哥	SD 苏丹	
CM 喀麦隆	IT 意大利		SE 瑞典	

抗艾滋病毒的青蒿素类药物

技术领域

本发明涉及碳环化合物领域，特别涉及倍半萜内酯的青蒿素类新的衍生物及其制法和主要在抗艾滋病毒方面的应用。

背景技术

艾滋病(AIDS)即获得性免疫缺损综合症(Acquired immune deficiency syndrome)，1981年在美国发现第一个病例，1983年法国巴士德研究所Montagnier教授首先从病人血液中分离出病毒，以后命名为HIV，从而证明艾滋病是以后天获得性免疫缺损为特征的病毒性传染病，由于艾滋病毒(HIV)亲嗜T淋巴细胞，它一方面在该细胞内不断繁殖、释放，释放出的病毒又侵入新的T淋巴细胞；另一方面被病毒侵入的T4淋巴细胞可与其他T4淋巴细胞融合形成巨型核合胞体，合胞体本身不稳定易引起死亡。病毒繁殖、释放，合胞体形成、死亡，如此反复因此造成机体深度的细胞免疫缺损，最终摧毁人体免疫功能导致死亡。艾滋病毒除对T淋巴细胞外还可侵犯巨噬细胞、B淋巴细胞等，尤其是在巨噬细胞内形成慢性感染，病毒可长期存在。本病发展可分带毒者，ARC期及AIDS病三阶段，一旦发展到AIDS病期，发病迅速，三年存活率不到10%。目前世界上约有2000万人感染了艾滋病毒，AIDS病期患者达600万，约有一半人已经死亡。中国也不例外，艾滋病已于1984年传入我国，目前我国已发现的HIV感染者890例，其中中国人带毒者740例，AIDS期病人5例，艾滋病毒感染者仍在不断地增加。

抗艾滋病毒药物，第一个被报导的是苏拉明(Suramin)，1985年发现AZT(叠氮胸腺嘧啶脱氧核苷)等具有体外抗艾滋病毒的活性，1986年进行了临床研究，1987AZT作为第一个被美国FDA批准用于治疗艾滋病的药。至今世界范围内筛选的有几百种新化合物及其配方，并包括几十种天然药物和中药。到目前为止，被美国FDA批准用于治疗艾滋病的药仅AZT、DDI(二脱氧肌苷)、DDC(二脱氧胞苷)；天然药物和中药中天花粉蛋白(GLQ[23])被FDA批准进行临床观察，但是这几种药都存在着不同类型的毒性，如AZT应用

4-6周后，病人出现骨髓抑制，继而发展成严重贫血；单独应用6个月后可产生耐药性；而且AZT并不能对巨噬细胞内感染的病毒有抑制作用，因而不能消除隐患，同时价格昂贵。DDC及DDI存在对外周神经的毒性，服药6周后即出现，应用较大剂量，即使停药一年仍然有后遗症。天花粉蛋白在临床试用中发现了神经毒，严重者出现一时性痴呆，甚至昏迷，实验研究表明天花粉蛋白处理感染HIV的巨噬细胞，产生和释放可溶性毒性物质，对人脑细胞有严重的破坏作用。

到目前为止在世界范围内被实验研究和评价的有几百种药物及其配方、天然药物、单味中药及复方中药中除很少数已分离了有效成分，如：日本报导甘草甜素、香菇多糖等，美国加州大学报导的紫花地丁有效成分等，而大多数均以粗提物进行实验，化合物中多为核苷，腺苷或肽类衍生物。及至1992年在荷兰阿姆斯特丹(Amsterdam)举办的世界艾滋病大会上，仍未见药物研究有突破性进展。

发明内容

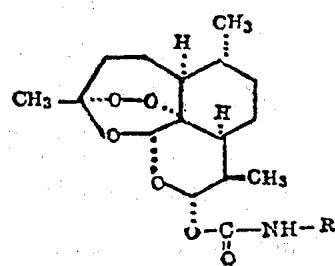
为了克服现有技术的不足，本发明目的在于提供一种新型毒性低、价廉的抗艾滋病毒类的药物。

本发明的另一目的在于提供一种制备上述药物的方法。

本发明的又一目的在于提供该药物的用途，特别是对艾滋病毒的作用。

本发明的目的是这样达到的：

本发明涉及一种以下列通式(I)表示的化合物及其药物学上可接受的盐，



(I)

其中，R 为选自C1 - C4的烷基、C3-C6的环烷基、卤代或硝基取代或未取代的苯基、卤代或硝基取代或未取代的联苯基、卤代或硝基取代或未取代的萘基。

上述的以通式(I)表示的化合物中，其典型的化合物包括：二氢青蒿素甲基氨基甲酸酯，二氢青蒿素乙基氨基甲酸酯，二氢青蒿素正丙基氨基甲酸酯，二氢青蒿素正丁基氨基甲酸酯，二氢青蒿素环己基氨基甲酸酯，二氢青蒿素苯基氨基甲酸酯，二氢青蒿素基-3-氯代苯基氨基甲酸酯，二氢青蒿素-4-氯代苯基氨基甲酸酯，二氢青蒿素-4-溴代苯基氨基甲酸酯，二氢青蒿素-4-硝基苯基氨基甲酸酯，二氢青蒿素-p-联苯基氨基甲酸酯，二氢青蒿素-1-萘基氨基甲酸酯。

本发明还涉及一种制备如通式(I)所述的化合物的方法，包括以下步骤：

向溶于二氯甲烷溶液内的二氢青蒿素中加入异氰酸酯类化合物，其二氢青蒿素与异氰酸酯类化合物的摩尔比例(mol/mol)为1：

1 至1 : 2，得一反应液；

将该反应液搅拌回流1 - 3天；

过滤反应液，蒸干滤液，得固体物；

将该固体物经硅胶柱层析，用按体积比(V/V)为5 : 5 - 9 : 1 的石油醚/乙酸乙酯洗脱；

收集所需的馏份，去除溶剂，得结晶物。

在上述的方法中，所述的异氰酸酯类化合物包括异氰酸烷基酯，异氰酸苯基酯，异氰酸环己基酯，异氰酸联苯基酯和异氰酸萘基酯。

本发明也涉一种含所述的化合物的药物组合物，以及该化合物在制备预防和治疗艾滋病药物中的应用，制备抗疟药物中的应用和在制备抗弓形虫药物中的应用。

本发明的化合物具有如下优点：

1 本发明之化合物对HIV 病毒有较强的抑制和杀灭作用，并且对动物和人的毒性低。

2 本发明之化合物不仅对T 细胞内的HIV 有作用，而且对巨噬细胞内的HIV 有明显的作用。

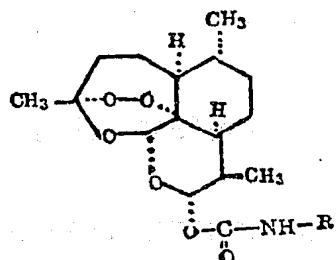
换言之，本发明采用了我国具有丰富资源的中药青蒿，即植物

黄花蒿 (*Artemisia annua L.*) 中提取的青蒿素 (artemisinin)，其系列衍生物在抗艾滋病毒的作用上取得突破性进展，从而完成本发明目的。

以下对本发明进行详细说明。

青蒿素 (Artemisinin) 是我国首次从植物黄花蒿 (*Artemisia annua L.*) 中提出的一种新型结构的抗疟有效成分，它是一种带有过氧桥的倍半萜内酯，各衍生物均由二氢青蒿素衍化而成。

本发明涉及一种以下列通式(I) 表示的化合物及其药物学上可接受的盐，



(I)

其中，R 为选自C1 - C4的烷基、C3-C6的环烷基、卤代或硝基取代或未取代的苯基、卤代或硝基取代或未取代的联苯基、卤代或硝基取代或未取代的萘基。

本发明采用制备如通式(I) 所述的化合物的方法，包括以下步骤：

向溶于二氯甲烷溶液内的二氢青蒿素中加入异氰酸酯类化合物，其二氢青蒿素与异氰酸酯类化合物的摩尔比例 (mol/mol) 为1 : 1 至1 : 2，得一反应液；

将该反应液搅拌回流1 - 3 天；

过滤反应液，蒸干滤液，得固体物；

将该固体物经硅胶柱层析，用按体积比 (V/V) 为5 : 5 - 9 : 1 的石油醚/乙酸乙酯洗脱；

收集所需的馏份，去除溶剂，得结晶物。

在上述的方法中，所述的异氰酸酯类化合物包括异氰酸烷基酯，异氰酸苯基酯，异氰酸环己基酯，异氰酸联苯基酯和异氰酸萘基酯。从而制得本发明所述的化合物及其药物学上可接受的盐。这些化合

物包括二氢青蒿素甲基氨基甲酸酯，二氢青蒿素乙基氨基甲酸酯，二氢青蒿素正丙基氨基甲酸酯，二氢青蒿素正丁基氨基甲酸酯，二氢青蒿素环己基氨基甲酸酯，二氢青蒿素苯基氨基甲酸酯，二氢青蒿素-3-氯代苯基氨基甲酸酯，二氢青蒿素-4-氯代苯基氨基甲酸酯，二氢青蒿素-4-溴代苯基氨基甲酸酯，二氢青蒿素-4-硝基苯基氨基甲酸酯，二氢青蒿素-p-联苯基氨基甲酸酯，二氢青蒿素-1-萘基氨基甲酸酯。

本发明方法中一般采用本领域技术人员公知的二氯甲烷的浓度来溶解所述的二氢青蒿素，如其浓度可为99.0%。

以上的本发明化合物用作药物时，可以直接使用，或是以药物组合物的形式使用。该药物组合物含有如0.1-99.5%，优选为0.5-90%的本发明化合物，其余为药物学上可接受的，对人和动物无毒和惰性的载体。

所述的载体是一种或多种选自固体、半固体和液体稀释剂、填料以及药物制品辅剂。建议将所述的药物组合物以单位体重服用量的形式使用。本发明的药物可以经静脉、骨髓、口服、组织、局部（如经皮）或直肠给药。无庸置言，剂量形式与所选择的给药途径相适应。口服方式是优选的。

口服可服用其固体或液体制剂，如粉剂、片剂、糖衣剂、胶囊、粒剂、悬浮液、糖浆、滴丸和舌下含服剂型等。

本发明的药物化合物的治疗，其每次给药量优选是根据患者的状态（如年龄和体重）、给药途径、疾病类型和患病程度等来决定。但是，通常情况下，本发明化合物的普通有效剂量是每人每天0.5-1.5毫克，优选为0.6-1毫克。

本发明的最佳实施方式

以下的实验例进一步说明本发明之药物化合物的药理和毒理作用：

实验例一

抗HIV病毒的实验

A 对MT4细胞的作用

1. 实验材料

病毒为HIV-1，该病毒是法国巴斯德研究所 Montagnier教授所赠送，实验中所用病毒量滴度为 1×10^4 T C I D₅₀/ml；用CEM细胞保存HIV-1病毒，由中国预防医学科学院病毒研究所HIV实验室传代培养：

药物用青蒿素、二氢青蒿素、青蒿琥酯、蒿甲醚、二氢青蒿素甲氨基甲酸酯、二氢青蒿素苯氨基甲酸酯、青蒿素吗啉丙基醚马来酸盐、12 - 羟基青蒿素二乙氨基乙基醚马来酸盐、去氧青蒿素吗啉乙基醚马来酸盐、青蒿素吗啉丙醇基醚马来酸盐、青蒿素3, 5 - 二吗啉甲基 - 4 - 羟基苄醚马来酸盐、12 - 羟基青蒿素间氯苯甲酸酯、青蒿素3 - 吡咯烷甲基 - 4 - 羟基苯甲酸酯草酸盐、青蒿素3 - 吗啉甲基 - 4 - 羟基苯甲酸酯草酸盐；阳性对照药 AZT，各种药液原液浓度均为1mg/ml。

2. 实验方法

a. 将新鲜培养的MT4细胞(5×10^5 ml)与病毒液(10^{-3} TCID₅₀/ml)共同培育，CO₂培养箱中37°C作用1-1.5小时，以RPMI 1640完全培养基(含10%小牛血清及抗生素，如青霉素)洗去未与细胞结合的病毒，以完全培养基校正浓度备用。

实验于96孔板中进行，每孔中加入0.1 ml上述感染病毒的MT4细胞悬液，然后加入0.1 ml不同浓度的药液。另设阳性药AZT对照组，同时还设无药液的病毒对照(仅有病毒感染的MT4细胞)，每个浓度的药液设两孔。试验组和对照组于37°C下CO₂培养箱中培养，三天后换药液六天后进行下列实验观察：

b. 细胞生长情况观察：以胎芬兰染色法(Trypan blue dye)观察各组活细胞量；

c. 病毒抗原表达的测定：以免疫酶法检查病毒抗原表达，即用带圆孔的载玻片各组细胞分别涂于孔内，每个药物浓度涂两孔，冷丙酮固定，并滴加抗HIV阳性血清，在37°C下CO₂培养箱中培养30分

钟后，以PBS洗三次，再滴加酶标 SPA与上述同样条件培育30分钟，以 PBS洗三次，然后置于底物液中染色2-3分钟，蒸馏水洗清玻片，在显微镜下观察，正常细胞为无色带有病毒的细胞呈棕红色。

3. 结果判定

病毒对照组涂片见许多明显的棕红色细胞。

AZT 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} 各组完全不见棕红色细胞，表明方法可靠，所用记号如下：

" - " 表示全孔未见阳性细胞；

" ± " 表示全孔仅有1-2个可疑阳性细胞；

" + " 表示全孔有2-3个阳性细胞；

实验重复两至三次。

各药物原液为 1mg/1ml, 实验取 0.1ml加入0.1ml带病毒的细胞悬液，故作用浓度如下：原液组为0.1mg/0.2ml 即 0.5mg/ml, 1×10^{-1} 组为0.05mg/ml, 1×10^{-2} 组为0.005mg/ml, 1×10^{-3} 为0.0005mg/ml亦0.5 μ g/ml以此类推。

表1 比较几种青蒿素化合物对HIV-1的作用(MT₄)

药物\浓度	1 X 10 ⁻¹ (50ug/ ml)	1 X 10 ⁻² (5ug/ ml)	1X10 ⁻³ (0.5ug/ ml)	1 X 10 ⁻⁴ (0.05ug/ ml)
青蒿素	-	-	+	+
二氢青蒿素	-	-	±	+
青蒿琥酯	-	-	-	+
蒿甲醚	-	-	±	+
二氢青蒿素	-	-	-	-
甲氨基甲酸酯	-	-	-	-
二氢青蒿素	-	-	-	-
苯氨基甲酸酯	-	-	-	±
AZT	-	-	-	/
青蒿素吗啉丙基醚马来酸盐	-	+	-	+
12 - 羟基青蒿素二乙氨基乙基醚马来酸盐	±	-	+	+
去氧青蒿素吗啉乙基醚马来酸盐	+	-	+	+
青蒿素吗啉丙醇基醚马来酸盐	+	-	+	+
青蒿素3, 5 - 二吗啉甲基 - 4 - 羟基苯醚马来酸盐	+	-	+	+
12 - 羟基青蒿素间氯苯甲酸酯	-	-	+	+
青蒿素 3 - 吡咯烷甲基 - 4 - 羟基苯甲酸酯草酸盐	-	-	+	+
青蒿素 3 - 吗啉甲基 - 4 - 羟基苯甲酸酯草酸盐;	±	-	+	+

根据表1 可见，本发明之典型化合物二氢青蒿素甲氨基甲酸酯和二氢青蒿素苯氨基甲酸酯对HIV 病毒具有明显的抑制作用。

B 对U937细胞的作用

另外，本发明还按实验例一相同的方法进一步做了本发明部分化合物对U937细胞株(巨噬细胞株)感染的HIV-1的抑制作用，分别检测细胞中的HIV-1抗原和逆转录酶，其结果见下面的表2：

表2 本发明部分化合物对U937感染的HIV-1的抑制作用

药物及 剂量	细胞株及病毒	抗原测定 (IE)	逆转录酶活性 (CPM)
青蒿琥酯 (50μg/ml)	U937 HIV-1	-	- (4846)
AZT (1μg/ml)	U937 HIV-1	+	+ (10865)
空白对照	U937 HIV-1	+	+ (24502)
二氢青蒿素 苯氨基甲酸酯 (50μg/ml)	U937 HIV-1	-	- (2305)
二氢青蒿素 甲氨基甲酸酯 (50μg/ml)	U937 HIV-1	-	- (4463)
空白对照	U937 HIV-1	+	+ (24502)

从表2 中明显可以看出本发明的化合物对U937感染的HIV -1病

毒有明显抑制作用，而AZT则无此作用。

实验例二 抗疟作用

对伯氏疟原虫 (*plasmodium berghei*) 红内期的作用。

1. 小鼠体内四天抑实验

实际采用Peters的四天抑制实验法测定SD₅₀。

瑞士种昆明远交系小鼠(中国医学科学院 动物中心供给)，体重18~22克。于接种当天腹腔注射接种 1×10^7 感染疟原虫的红血球。同天分别口服不同浓度的下列药物，二氢青蒿素甲氨基甲酸酯，二氢青蒿素正丁基氨基甲酸酯，二氢青蒿素苯氨基甲酸酯，二氢青蒿素-4 - 硝基苯基氨基甲酸酯，连续给药4天(D0 ~ D3)；第5天(D4) 取尾血涂薄片，厚片。姬姆萨染色。显微镜下计数红血球及寄生率，给药组与对照组寄生率比较按下列公式算出抑制率，几个剂量组的抑制率，求出SD₅₀。

对照组寄生率 - 给药组寄生率

$\times 100$

对照组寄生率

结果如下：

表3

药物	SD ₅₀ mg/kg/天
二氢青蒿素甲氨基甲酸酯	0.24
二氢青蒿素正丁基氨基甲酸酯	0.25
二氢青蒿素苯氨基甲酸酯	0.29
二氢青蒿素-4 - 硝基苯基氨基甲酸酯	0.30

实验例三

抗弓形虫的作用

本实验采用体外培养法。自BALB/c小鼠(法国巴黎六大提供)取腹腔巨噬细胞，离心、洗涤、计数。每个培养皿中加 1.28×10^5 细胞，37℃培育3 小时，使细胞吸附。洗去未吸附者，感染弓形虫(Toxoplasma Gandei，法国巴黎六大提供)。虫数为 1×10^6 ，使细胞与虫之比为1 : 5 左右。37℃培育48 小时后，加药，药物浓度为50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，并设一不给药组对照。37℃培育48 小时后，染色，光镜下观察、计数巨细胞的百分感染率及每100个巨噬细胞中的虫数。结果表明二氢青蒿素甲氨基甲酸酯体外实验有明显的抗弓形虫的作用。

表4 二氢青蒿素甲氨基甲酸酯体外抗弓形虫的作用

剂量 $\mu\text{g}/\text{ml}$	巨噬细胞感染率	抑制率 (%)	100个巨噬细胞 中的虫数	抑制率 (%)
50	0.67	99.1	2.67	99.5
100	0	100	0	100
200	0	100	0	100
对照组	75.60		544.00	

实验例四

本发明之化合物的毒理实验

小鼠急性毒性实验：

动物：瑞士种昆明远交系小鼠(中国中医研究院动物房提供)雌雄各半。其体重为20 - 22 克，周令小于6 周，雌雄分笼饲养。实验前，小鼠于实验室饲养观察3 - 5 天自由摄食摄水。

药物：二氢青蒿素甲氨基甲酸酯，二氢青蒿素苯基氨基甲酸酯。

将上述的二种药物分别研成细粉，溶于花生油中。最大剂量分别是 $2\ 0\ 0\ 0\ \text{mg}/\text{kg}$ 、 $2\ 1\ 6\ 1\ \text{mg}/\text{kg}$ 。前者组距为0.7，后者为0.68。各设五个剂量组。

方法：小鼠灌胃给药，一天给药观察中毒表现、死亡情况，记录三天的死亡率，计算LD值(LD₅, LD₅₀, LD₉₅)及B值(斜率)。

其结果：动物死亡前出现以下症状及指徵，如活动减少，拒食，毛发疏松，进而伏卧不起，心律减慢及至死亡。大剂量组三天内全部死亡。死亡分布及LD值、B值分别为 $1065.89\ \text{mg/kg}$ 及 $1120.84\ \text{mg/kg}$ 。详见表5、表6。

另外，本发明化合物的同类药物的毒性也低于蒿甲醚，二氢青蒿素或蒿酯钠。详见表7。

表5

小鼠死亡分布情况

药物剂量 mg/kg	雌性		雄性		雌 + 雄 实验数/死亡数
	实验数	死亡数	实验数	死亡数	
2000	6/6		6/6		12/12
1400	6/4		6/3		12/7
980	6/2		6/2		12/4
二氢青蒿素	6/1		6/2		12/3
苯氨基甲酸酯	6/0		6/1		12/1
2161	5/5		5/5		10/10
1470	5/2		5/3		10/5
二氢青蒿素甲	5/2		5/2		10/4
氨基甲酸酯	5/1		5/1		10/2
462	5/0		5/1		10/1

表6

小鼠急性毒理LD值及斜率(B值)

药物	性别	LD50	LD50	LD50	B值
	♀	603.91	1097.23	1993.51	6.343
二氢青蒿素	♂	352.10	1039.73	3069.59	3.498
苯氨基甲酸酯	♀ + ♂	463.33	1065.89	2452.08	4.546
二氢青蒿素甲	♀	543.17	1213.64	2711.67	4.711
氨基甲酸酯	♂	360.92	1028.85	2932.84	3.620
	♀ + ♂	435.75	1120.84	2883.02	4.01

表7 几种同类药的LD₅₀ 的比较

药 物	LD ₅₀	备 注*
	(mg / kg)	
蒿甲醚	263	I . M
蒿酯钠	769	I . V
二氢青蒿素	765	P . O
二氢青蒿素		
苯氨基甲酸酯	1065	P . O
二氢青蒿素甲		
氨基甲酸酯	1120	P . O

表7 中的* 为： I.M 肌肉注射； I.V 静脉注射；
P.O 灌胃给药。

亚急性毒性实验的结果表明 二氢青蒿素苯氨基甲酸酯，二氢青蒿素甲氨基甲酸酯的基本安全剂量为54 mg/kg/天和30.2 mg/kg/天。

以下实施例部分的一般说明。

以下实施例中涉及的熔点 (m.p.) 是用F i s h e r - J o h n s 熔点仪测定。元素分析采用的柱层用硅胶均为230-400目的硅胶60 (Merck 公司产品)。所用柱子为f l a s h - c h r o m a t o g r a p h y (Aldrich chemical Co.)。【α】的测定使用p e r k i n - E l m e r - 241 - MC 旋光仪在C H C l ₃ 测定。U V 光谱用H e w l e t t - P a c k a r d - 8450 - A 仪器在C H C l ₃ 测定，单位为 。λ_{max} (log ε) nm。I R (cm⁻¹) 使用KBr 片在B e c k m a n - 4320 仪器上测定。质谱仪为F innigan - 1015 D 型，使用化学离子源 (C I) (m/z)。¹ H - NMR 仪器为J EOL - F X - 100 和N i c o l e t

-500型，使用Me₄Si为内标（δ, ppm, J Hz）。柱层析的铂份用薄板层析检测。使用硅胶GF（10×20cm）板（Analtech, 1m）展示剂为石油醚/乙醚乙酯。碘蒸气显色。

实施例1. 二氢青蒿素甲氨基甲酸酯制备

二氢青蒿素2.84 mg (1 mmol) 溶于二氯甲烷6 ml 中，再加入甲基异氰酸酯 (methyl isocyanate) 6.3 mg (1.1 mmol)，加热回流2天，过滤，滤液蒸干得固体。再经硅胶柱层析，用石油醚/乙酸乙酯 (8:2) 洗脱，分别收取所需馏份，蒸干得白色固体标题化合物结晶2.17.6 mg。

m.p.: 175 - 177 °C; MS (CI, NH₃): 342 (M⁺⁺¹)

¹ NMR (CDCl₃) δ (ppm)

5.50 (s, 1 H, C₅-H)

5.77 (d, 1 H, C₁₂-H)

2.65 (m, 1 H, C₁₁-H)

元素分析 C₁₇H₂₂N₂O₆ 1/2 H₂O

C 58.27 H 8.05 N 4.00

实验值 C 58.48 H 8.09 N 4.08

实验例2 二氢青蒿素苯基氨基甲酸酯制备

二氢青蒿素1.42 mg (0.5 mmol) 溶于二氯甲烷6 ml 中，加入苯基异氰酸酯6.0 mg (0.5 mmol) 加热回流二天。过滤，滤液在40 °C下减压蒸干得油状物，再经硅胶柱层，石油醚/乙酸乙酯 (9:1) 洗脱，分别收集所需馏份。蒸除溶剂后得白色粉末。用异丙醚重结晶，得标题化合物产品1.67 mg。

m. p.: 110 - 113 °C, $[\alpha]^{25}_{D} = +11.78^{\circ}$
 $(C = 0.85, \text{CHCl}_3)$, UV: 250 (4.40)

IR (KBr), 3315 (NH) 2932, 2875, 1728 (carbanate) 870, 845, 820 (peroxyde), 742, 684 (aromatics)

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm)
 5.49 (s, 1 H, C₅-H)
 5.78 (d, 1 H, J = 6.3, C₁₂-H)
 2.36 (m, 1 H, C₁₁-H)

MS (CI, NH₃), 404 (M⁺ + 1)

元素分析: C₂₂H₂₉NO₆

C 65.49, H 7.24, N 3.47

实验值 C 65.34, H 7.85, N 3.93

实施例3 二氢青蒿素对硝基苯氨基甲酸酯制备

二氢青蒿素 1.42 mg (0.5 mmol) 溶于二氯烷 1.0 mL 中, 加入对硝基苯基异氰酸酯 1.23 mg (0.75 mmol), 经硅胶柱层析用石油醚/乙酸乙酯 (7:3) 洗脱, 分别收集馏份, 将所需部分蒸干得标题化合物白粉末。

$[\alpha]^{25}_{D} = +5.31^{\circ}$ (C = 1.4, CHCl₃), IR (KBr): 3300 (NH), 2925, 2870, 1742 (carbanate), 1540, 1330 (NO₂), 845 (peroxyde), 740, 680 (aromatic). UV: 132 (4.26)

¹H-NMR: δ (ppm)

5 .5 7 (s , 1 H, C₅ - H)
5 .7 9 (d , 1 H, C₁₂ - H)
2 .6 6 (m, 1 H, C₁₁ - H)

MS (C I , NH₃) : 449 (M⁺ + 1)

实施例4：二氢青蒿素间硝基苯氨基甲酸酯制备

按实施例3 相同的方法用用硝基苯异氰酯制得标题化合物。
其m. p.: 143 - 145 °C, UV 242 (4.09)。

实施例5：二氢青蒿素邻硝基苯氨基甲酸酯制备,

按实施例3 相同的方法, 用邻硝基苯异氰酸酯制得该标题化合物。

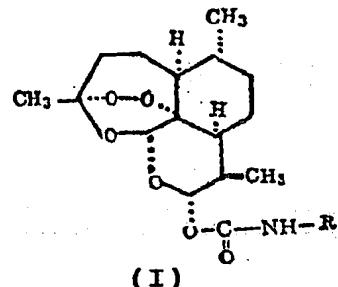
其m p.: 157 - 159 °C, UV 242 (4.06)。

工业应用性

本发明之化合物可用于制备预防和治疗艾滋病药物, 以及制备抗疟药物和抗弓形虫药物。

权利要求

1. 一种以下列通式(I)表示的化合物及其药物学上可接受的盐，



其中，R为选自C1-C4的烷基、C3-C6的环烷基、卤代或硝基取代或未取代的苯基、卤代或硝基取代或未取代的联苯基、卤代或硝基取代或未取代的萘基。

2. 如权利要求1所述的化合物，其中所述的化合物是二氢青蒿素甲基氨基甲酸酯。
3. 如权利要求1所述的化合物，其中所述的化合物是二氢青蒿素乙基氨基甲酸酯。
4. 如权利要求1所述的化合物，其中所述的化合物是二氢青蒿素正丙基氨基甲酸酯。
5. 如权利要求1所述的化合物，其中所述的化合物是二氢青蒿素正丁基氨基甲酸酯。
6. 如权利要求1所述的化合物，其中所述的化合物是二氢青蒿素环己基氨基甲酸酯。
7. 如权利要求1所述的化合物，其中所述的化合物是二氢青蒿素苯基氨基甲酸酯。
8. 如权利要求1所述的化合物，其中所述的化合物是二氢青蒿素基-3-氯代苯基氨基甲酸酯。
9. 如权利要求1所述的化合物，其中所述的化合物是二氢青蒿素-4-氯代苯基氨基甲酸酯。
10. 如权利要求1所述的化合物，其中所述的化合物是二氢青蒿素-4-溴代苯基氨基甲酸酯。
11. 如权利要求1所述的化合物，其中所述的化合物是二氢青蒿素-4-硝基苯基氨基甲酸酯。

12. 如权利要求1所述的化合物，其中所述的化合物是二氢青蒿素-p-联苯基氨基甲酸酯。

13. 如权利要求1所述的化合物，其中所述的化合物是二氢青蒿素-1-萘基氨基甲酸酯。

14. 一种制备如权利要求1所述的化合物的方法，包括以下步骤：

向溶于二氯甲烷溶液内的二氢青蒿素中加入异氰酸酯类化合物，其二氢青蒿素与异氰酸酯类化合物的摩尔比例 (mol/mol) 为1：

1 至1：2，得一反应液；

将该反应液搅拌回流1-3天；

过滤反应液，蒸干滤液，得固体物；

将该固体物经硅胶柱层析，用按体积比 (V/V) 为5：5-9：1 的石油醚/乙酸乙酯洗脱；

收集所需的馏份，去除溶剂，得结晶物。

15. 如权利要求14所述的方法，其中所述的异氰酸酯类化合物包括异氰酸烷基酯，异氰酸苯基酯，异氰酸环己基酯，异氰酸联苯基酯和异氰酸萘基酯。

16. 如权利要求14所述的方法，其中所述的二氯甲烷的

17. 一种如权利要求14的方法制得的化合物

18. 一种含有如权利要求1所述的化合物的药物组合物。

19. 如权利要求1所述的化合物在制备预防和治疗艾滋病药物中的应用。

20. 如权利要求1所述的化合物在制备抗疟药物中的应用。

21. 如权利要求1所述的化合物在制备抗弓形虫药物中的应用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN 94/00056

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁵ C07D 493/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁵ C07D 493/18, 493/20, A61K 31/335, 31/35

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Xuan-de LUO et al, "Configuration of Antimalarials Derived from Qinghaosu: Dihydroqinghaosu, Artemether, and Artesunic Acid", Helv. Chim. Acta, Vol. 67 (1984) P1515—1523	1,7,11, 14—18,20,21
X	US 4,816,478 (Carl R. Thornfeldt) 28 March 1989 (28.03.89)	1—21

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claims(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 24 September 1994 (24.09.94)	Date of mailing of the international search report 20 OCTOBER 1994 (20.10.94)
Name and mailing address of the ISA/ Chinese Patent Office, 6 Xitucheng Rd. Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China	Authorized officer Mu Senchang
Faxsimile No. (86-1)2019451	Telephone No. 2093847

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information patent family members

International application No.
PCT/CN 94/00056

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4,816,478	28. 03. 89	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN 94/00056

A. 主题的分类 IPC⁶ C07D 493/18

按照国际专利分类表 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献 (标明分类体系和分类号)

IPC⁶ C07D 493/18, 493/20, A61K 31/335, 31/35

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

C. 相关文件

类型	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
X	Xuan-de Luo et al., 'Configuration of Antimalarials Derived from Qinghaosu : Dihydroqinghaosu, Artemether, and Artesunic Acid' Helv. Chim. Acta Vol 67 (1984) P1515-1523	1, 7, 11, 14-18, 20-21
X	US, 4, 816, 478 (Carl R. Thornfeldt) 28. 3月. 1989 (28. 03. 89)	1-21

 其余文件在C栏的续页中列出。 见同族专利附件。

- 引用文件的专用类型:
 - 'A' 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件
 - 'E' 在先文件,但是在国际申请日的同一日或之后公布的
 - 'L' 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件 (如详细说明)
 - 'O' 涉及口头公开、使用、展览或其它手段的文件
 - 'P' 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件
 - 'T' 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件,它与申请不相抵触,但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理
 - 'X' 特别相关的文件;当该文件被单独使用时,要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性
 - 'Y' 特别相关的文件;当该文件与其它一篇或多篇这类文件结合在一起,这种结合对本领域技术人员是显而易见的,要求保护的发明不能认为具有创造性
 - '&' 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期 24. 9月. 1994 (24. 09. 94)	国际检索报告邮寄日期 20 10月1994 (20. 10. 94)
国际检索单位名称和通讯地址 100088 中国北京市海淀区蔚蓝门桥西土城路6号 传真号 (86-1) 2019451	受权官员 穆森昌 电话号码 (86-1) 2093849

国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN 94/00056

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
US, 4, 816, 478	28. 03. 89	无	

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-225983

(43) 公開日 平成4年(1992)8月14日

(51) Int.Cl. ⁵ C 07 D 493/18 A 61 K 31/34	識別記号 ADY A E B	序内整理番号 7329-4C 7252-4C	F I	技術表示箇所
--	----------------------	------------------------------	-----	--------

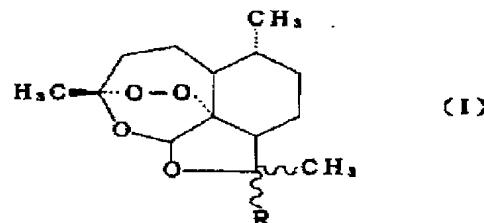
審査請求 未請求 請求項の数10(全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平3-128261	(71) 出願人 ヘキスト・アクチエンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国、フランクフルト・ア ム・マイン (番地無し)
(22) 出願日 平成3年(1991)5月2日	(72) 発明者 ビンドウマダーバン・ベヌゴバラン インド国セイン400061. プリンダバンソサ イエティ. フラットナンバー31. ビルディ ングナンバー45/エイ
(31) 優先権主張番号 90108580.3	(72) 発明者 チントマニ・プラバーカル・ババト インド国ボンペイ400082. ムランド/ウエ スト. ダルガロード. ヘキストクオーター ズ (番地なし)
(32) 優先日 1990年5月7日	(74) 代理人 弁理士 高木 千嘉 (外2名)
(33) 優先権主張国 オーストリア (AT)	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 3 α , 11 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 α α , 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11 α -ウンデカヒド
ロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ[3, 4-j] [1, 2]-ベンゾジオキセピンの9-

(57) 【要約】 (修正有)

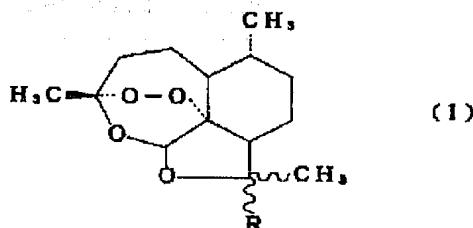
【構成】 次の式I

(置換分Rは、CHO, COOR₁, CH₂OR₂など
を示す) の化合物に関する。【効果】 この化合物は抗マラリア活性および抗ウイル
ス活性を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式I

【化1】



の化合物およびその薬学的に許容し得る塩。上記式において、Rは、 CHO 、 COOR_1 （式中、 R_1 は、水素、アルキル、置換されたアルキル、アルケニル、置換されたアルケニル、アルキニル、置換されたアルキニル基を示す）、 CH_2OR_2 （式中、 R_2 は、水素、アルキル、置換されたアルキル、アルケニル、置換されたアルケニル、アルキニル、置換されたアルキニル、ジアルキルアミノアルキル基または $3\alpha, 12\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5 α , 6, 7, 8, 8 α , 9, 10, 12 β , 12 α -ドデカヒドロ-3 β , 6 α , 9 β -トリメチルピラノ[4, 3- j] [1, 2]-ベンゾジオキセピン-10-イルまたは基 COR_3 （式中、 R_3 はアルキル、置換されたアルキルを示す）または基 SO_2R_4 （式中、 R_4 はアルキルまたはアリール基を示す）または基 $\text{C=XNR}_5\text{R}_5'$ （式中、XはOまたはSを示し、 R_5 は水素を示し、 R_5' はアルキルまたはアリール基を示しまたは $N\text{R}_5\text{R}_5'$ は複素環式基を示す）、 CONR_6R_7 （式中、 R_6 は水素、アルアルキルを示しそして R_7 は水素、アルキル、アリール、アラルキル基を示しまたはR₆およびR₇はこれらが結合している窒素と一緒にになって複素環式基（この基はさらに異種原子を含有していてもよくそして場合によっては1または2以上の位置において置換されていてもよい）を形成する）、 $\text{CH}=\text{CR}_8\text{R}_9$ （式中、 R_8 は水素、カルボキシアルキルを示しそして R_9 はカルボキシアルキル、アリールまたは複素環式基を示す）、 COSR_{10} （式中、 R_{10} はアルキル、置換されたアルキル、またはアリール基を示す）を示す。

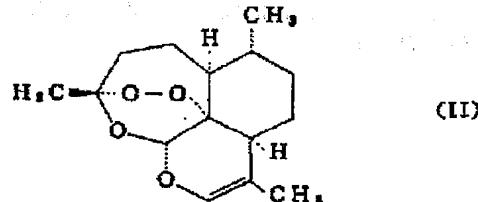
【請求項2】 Rが CHO または CH_2OR_2 を示し、 R_2 が水素、アルキル、置換されたアルキル、アルケニル、置換されたアルケニル、アルキニル、置換されたアルキニル、ジアルキルアミノアルキル基または $3\alpha, 12\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5 α , 6, 7, 8, 8 α , 9, 10, 12 β , 12 α -ドデカヒドロ-3 β , 6 α , 9 β -トリメチルピラノ[4, 3- j] [1, 2]-ベンゾジオキセピン-10-イルまたは基 COR_3 （式中、 R_3 はアルキル、置換されたアルキル基を示す）または基 SO_2R_4 （式中、 R_4 はアルキルまたはアリール基を示す）または基 $\text{C=XNR}_5\text{R}_5'$ （式中、XはOまたはSを示す）を示す請求項1記載の式Iの化合物。

【請求項3】 化合物が、 $3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5 α , 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11 α -ウンデカヒドロ-9-ホルミル-3 β , 6 α , 9-トリメチルピラノ[3, 4- j] [1, 2]ベンゾジオキセピン、 $3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5 α , 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11 α -ウンデカヒドロ-9-(2-プロピノキシ)メチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルピラノ[3, 4- j] [1, 2]ベンゾジオキセピン、 $3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5 α , 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11 α -ウンデカヒドロ-9-(2-プロペノキシ)メチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルピラノ[3, 4- j] [1, 2]

【化2】
10 $3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5 α , 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11 α -ウンデカヒドロ-9-(p -トルエンスルホニルオキシ)メチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルピラノ[3, 4- j] [1, 2]ベンゾジオキセピン、 $3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5 α , 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11 α -ウンデカヒドロ-9-(4-クロロフェニルアミノカルボニルオキシ)メチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルピラノ[3, 4- j] [1, 2]ベンゾジオキセピン、 $3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5 α , 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11 α -ウンデカヒドロ-9-(4-フルオロフェニルアミノカルボニルオキシ)メチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルピラノ[3, 4- j] [1, 2]ベンゾジオキセピン、 $3\alpha, 12\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5 α , 6, 7, 8, 8 α , 9, 10, 12 β , 12 α -ドデカヒドロ-10 α -[$3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5 α , 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11 α -ウンデカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルピラノ[3, 4- j] [1, 2]ベンゾジオキセピン-9-メチレン]オキシ-3 β , 6 α , 9 β -トリメチルピラノ[4, 3- j] [1, 2]ベンゾジオキセピン-9-メチレン]オキシ-3 β , 6 α , 9 β -トリメチルピラノ[4, 3- j] [1, 2]ベンゾジオキセピンである請求項1または2記載の化合物。

【請求項4】 式II

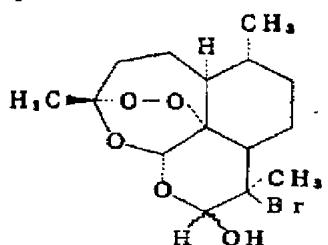
【化2】



50 の化合物を臭素化剤で処理しそして次に加水分解して式

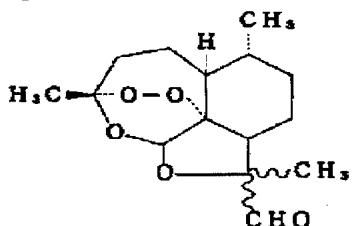
III

【化3】



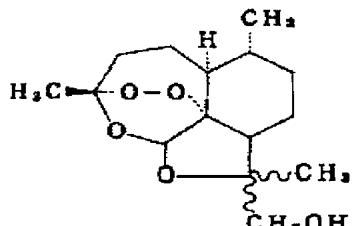
の化合物を得、この化合物を式 I a

【化4】



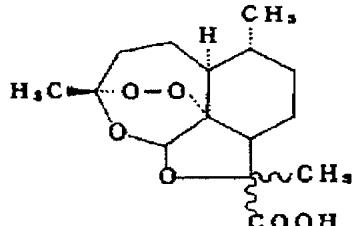
の化合物を製造するために、有機塩基で処理し、または式 I b

【化5】



の化合物を製造するために、式 I a の化合物を還元剤で処理し、または式 I c

【化6】

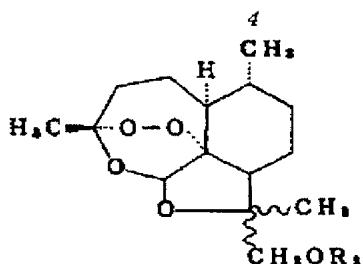


の化合物を製造するために、式 I a の化合物を酸化剤で処理し、または式 I d

【化7】

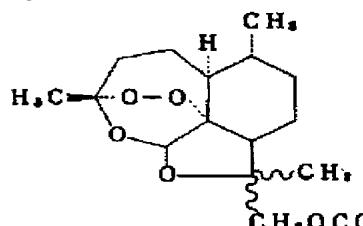
(III)

10



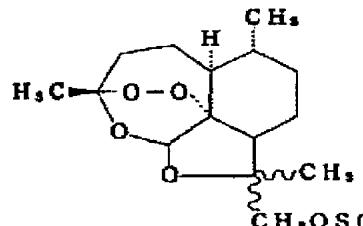
の化合物を製造するために、式 I b の化合物をアルキル化するかまたはジヒドロアルテミシニンと反応させ、または式 I e

【化8】



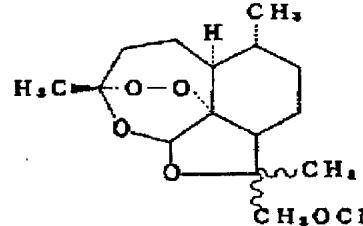
の化合物を製造するために、式 I b の化合物を式 R3C OCl の酸塩化物と反応させ、または式 I f

【化9】



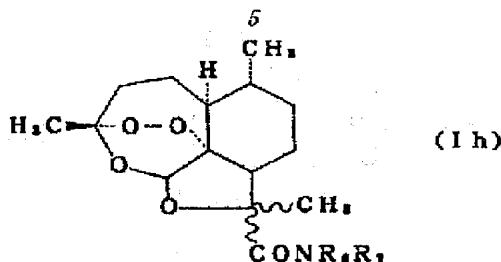
の化合物を製造するために、式 I b の化合物を R4SO2Cl の化合物と反応させ、または式 I g

【化10】



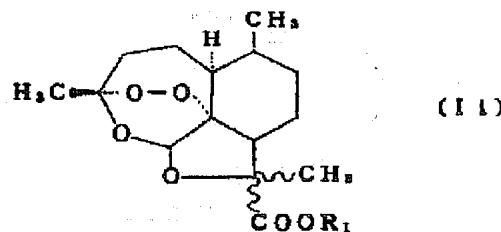
の化合物を製造するために、式 I b の化合物を式 R5N CX の化合物と反応させ、または式 I h

【化11】



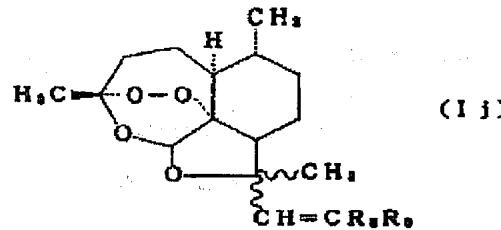
の化合物を製造するために、式 I c の化合物を塩化チオニルと反応させそして次に式 N R₆ R₇ の化合物と反応させ、または式 I i

【化 1 2】



の化合物を製造するために、式 I c の化合物を塩化チオニルと反応させそして次に式 R₁ OH の化合物と反応させ、または式 I j

【化 1 3】



(式中、R₆ および R₇ はカルボエトキシを示す) の化合物を製造するために、式 I a の化合物を式 CH₂ R₈ R₉ の化合物で処理し、式 I j (式中、R₆ は水素を示しそして R₇ はカルボアルキル、アリールまたは複素環式基を示す) の化合物を製造するために、式 I a の化合物を式 P h₃ P = C H R₉ の化合物で処理する (置換基 R₁ ~ R₉ は、特に定義しない場合は、上記請求項におけると同意義を有す)、上記請求項の何れかの項記載の式 I の化合物の製法。

【請求項 5】 請求項 1 ~ 3 の何れかの項記載の化合物の少なくとも 1 種を含有する薬学的組成物。

【請求項 6】 式 I の化合物を投与に適した形態に変換する請求項 5 記載の薬学的組成物の製法。

【請求項 7】 マラリアの予防または治療に対する請求項 1 ~ 3 の何れかの項記載の式 I の化合物の使用。

【請求項 8】 ウイルスにより起る疾患の予防または治療に対する請求項 1 ~ 3 の何れかの項記載の式 I の化合物の使用。

【請求項 9】 請求項 5 記載の薬学的組成物を投与するマラリアの治療法。

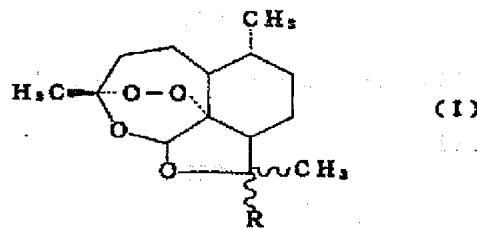
【請求項 10】 請求項 5 記載の薬学的組成物を投与するウイルス疾患の治療法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】 本発明は、新規な 3 α , 11 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 α α , 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11 α -ウンデカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4 - j] [1, 2] -ベンゾジオキセピンの 9-置換化合物、その薬学的に許容し得る塩、これらの化合物の製法および原生動物およびウイルス感染に対するこれらの化合物の使用に関するものである。

【0 0 0 2】 本発明の 9-置換された 3 α , 11 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 α α , 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11 α -ウンデカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4 - j] [1, 2] -ベンゾジオキセピン化合物は、一般式 I

【化 1 4】



により示される化合物およびその薬学的に許容し得る塩である。

【0 0 0 3】 上記式において、R は、CHO、COOR₁ (式中、R₁ は水素、アルキル、置換されたアルキル、アルケニル、置換されたアルケニル、アルキニル、置換されたアルキニル基を示す)、CH₂ OR₂ (式中、R₂ は、水素、アルキル、置換されたアルキル、アルケニル、置換されたアルケニル、アルキニル、置換されたアルキニル、ジアルキルアミノアルキル基または 3 α , 1

2 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 α α , 6, 7, 8, 8 α α , 9, 10, 12 β , 12 α -ドデカヒドロ-3 β , 6 α , 9 β -トリメチルビラノ [4, 3 - j] [1, 2] -ベンゾジオキセピン-10-イルまたは基 COR₃ (式中、R₃ はアルキル、置換されたアルキルを示す) または基 SO₂ R₄ (式中、R₄ はアルキルまたはアリール基を示す) または基 C = X N R₅ R₆' (式中、X は O または S を示し、R₅ は水素を示し、R₆' はアルキルまたはアリール基を示しましたは N R₅ R₆' は複素環式基を示す) を示す)、CON R₆ R₇ (式中、R₆ は水素、アルキルを示しそして R₇ は水素、アルキル、アリール、アラルキル基を示しましたは R₆ および R₇ はこれらが結合している窒素と一緒にになって複素環式基 (この基はさらに異種原子を含有していてもよくそして場合によっては 1 または 2 以上の位置において置換されていてもよい) を形成

50 または 2 以上の位置において置換されていてもよい) を形成

する]、 $\text{CH}=\text{C R}_8\text{R}_9$ (式中、 R_8 は水素、カルボキシアルキルを示しそして R_9 はカルボキシアルキル、アリールまたは複素環式基を示す)、 COSR_{10} (式中、 R_{10} はアルキル、置換されたアルキル、またはアリール基を示す)を示す。

【0004】上述した式において、種々な置換基は、1または2の表記法によってフラノ (3,4-*j*) (1,2) ベンゾジオキセビン核に結合しているものとして説明されており、実線は、 β -配向 (すなわち、分子の平面の上方) にある置換基を示しそして破線は、 α -配向 (すなわち、分子の平面の下方) にある置換基を示す。式は、すべて絶対配置で化合物を示すように記載した。フラノー (3,4-*j*) (1,2) -ベンゾジオキセビン核が天然に存在する物質から誘導されたものである限り、これらの化合物ならびに最終生成物は、本明細書に示した単一の絶対配置のフラノ (3,4-*j*) (1,2) ベンゾジオキセビン核を有す。しかしながら、本発明の方法は、同様に、ラセミ系のフラノ (3,4-*j*) (1,2) -ベンゾジオキセビンの合成に適用されることを企図するものである。フラノ (3,4-*j*) (1,2) -ベンゾジオキセビン核の光学中心のほかに、該核上の置換基も、また、本発明の化合物の光学的性質に寄与しそして普通の方法による、例えば、光学的に活性な酸による分割の手段を与えるキラル中心を含有することができる。波線は、置換基が α -配向または β -配向をとることができるということを示す。本発明は、本発明の化合物がフラノ (3,4-*j*) (1,2) -ベンゾジオキセビン核のキラル中心に加えてキラル中心を有する場合の本発明のすべての光学的異性体およびラセミ形態を包含するものである。

【0005】アルキルなる用語は、メチル、エチル、ブロピル、ブチル、イソブロピル、*t*-ブチルのような $\text{C}_1\sim\text{C}_8$ の直鎖状または分枝鎖状の炭素化合物を示す。アルケニルなる用語は、1個または2個以上の二重結合を含有する直鎖状または分枝鎖状の炭素化合物を示す。適当な例は、アクリル、ステアリル、シンナミルである。

【0006】アルキニルなる用語は、1個または2個以上の三重結合を含有しそしてさらに二重結合を含有していくてもよい直鎖状または分枝鎖状の炭素化合物を示す。アルキニル基の例は、3-メチル-1-ベンチニル、1-ブチニル、3-メチル-1-ブチニル、2-ブチニル-1-ヒドロキシメチルである。

【0007】置換されたアルキル、アルケニルおよびアルキニルの置換基は、ハロゲン、ヒドロキシ、カルボキシ、ニトリル、アシリル、アリール、複素環式基または基 NR_6R_7 (式中、 R_6 および R_7 は上述した通りである)である。

【0008】アリールなる用語は、場合によっては、ハロゲン、アルキル、ニトロ、アミノ、ヒドロキシ、アルコキシ、カルボキシ、アルキルカルボキシレート、トリ

フルオロメチル、置換されたアミノ、アセチル、アルケニルオキシ、アルキニルオキシのような1個または2個以上の置換基により置換されていてもよいフェニル基を示す。複素環基なる用語は、例えば、場合によっては1または2以上の位置においてアルキル、アルコキシ、ヒドロキシ、ハロゲンまたはアリール基により置換されていてもよいペラジノ、モルホリノ、ピペリジノ、ピロリジノ、フタルイミドのような1個または2個以上の異種原子を含有する環基を示す。

10 【0009】本発明の好ましい化合物は、表1~4に示すとおりである。

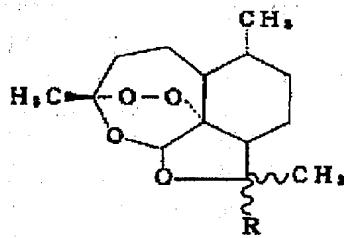
【0010】さらに、本発明の好ましい化合物は、Rが基 CHO または CH_2OR_2 (式中、 R_2 は上述したと同じ意義を有す) を示す式Iの化合物である。

【0011】本発明の特に好ましい化合物は、 $3\alpha, 1\alpha$ -エポキシ-3,4,5,5a $\alpha, 6, 7, 8, 8a, 9, 11, 11a$ -ウンデカヒドロ-9-ホルミル-3 $\beta, 6\alpha, 9$ -トリメチルフラノ [3,4-*j*] (1,2) ベンゾジオキセビン、 $3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3,4,5,5a $\alpha, 6, 7, 8, 8a, 9, 11, 11a$ -ウンデカヒドロ-9-(2-プロピノキシ)メチル-3 $\beta, 6\alpha, 9$ -トリメチルフラノ [3,4-*j*] (1,2) ベンゾジオキセビン、 $3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3,4,5,5a $\alpha, 6, 7, 8, 8a, 9, 11, 11a$ -ウンデカヒドロ-9-(2-プロペノキシ)メチル-3 $\beta, 6\alpha, 9$ -トリメチルフラノ [3,4-*j*] (1,2) ベンゾジオキセビン、 $3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3,4,5,5a $\alpha, 6, 7, 8, 8a, 9, 11, 11a$ -ウンデカヒドロ-9-(*p*-トルエンスルホニルオキシ)メチル-3 $\beta, 6\alpha, 9$ -トリメチルフラノ [3,4-*j*] (1,2) ベンゾジオキセビン、 $3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3,4,5,5a $\alpha, 6, 7, 8, 8a, 9, 11, 11a$ -ウンデカヒドロ-9-(4-クロロフェニルアミノチオカルボニルオキシ)メチル-3 $\beta, 6\alpha, 9$ -トリメチルフラノ [3,4-*j*] (1,2) ベンゾジオキセビン、 $3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3,4,5,5a $\alpha, 6, 7, 8, 8a, 9, 11, 11a$ -ウンデカヒドロ-9-(4-フルオロフェニルアミノチオカルボニルオキシ)メチル-3 $\beta, 6\alpha, 9$ -トリメチルフラノ [3,4-*j*] (1,2) ベンゾジオキセビン、 $3\alpha, 12\alpha$ -エポキシ-3,4,5,5a $\alpha, 6, 7, 8, 8a, 9, 10, 12\beta, 12a$ -ウンデカヒドロ-10 α -(3 $\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3,4,5,5a $\alpha, 6, 7, 8, 8a, 9, 11, 11a$ -ウンデカヒドロ-3 $\beta, 6\alpha, 9$ -トリメチルフラノ [3,4-*j*] (1,2) ベンゾジオキセビン-9-メチレン)オキシ-3 $\beta, 6\alpha, 9\beta$ -トリメチルピラノ [4,3-*j*] (1,2) ベンゾジオキセビンおよび $3\alpha, 12\alpha$ -エポキシ-3,4,5,5a $\alpha, 6, 7, 8, 8a, 9, 10, 12\beta, 12a$ -ドデカヒドロ-10 β -(3 $\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3,4,5,5a $\alpha, 6, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 11a$ -ウンデカヒド

9

ロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ[3, 4- β]【1, 2】ベンゾジオキセピン-9-メチレン]オキシ
-3 β , 6 α , 9 β -トリメチルピラノ[4, 3- β]】*

* [1, 2] ベンゾジオキセピンである。
【0012】
【表1】



10

【表1】

R	融点(℃)	收率(%)
CHO	100	85
CH ₂ OH	135-138	72
COOH	166-167	76
CH ₂ OCH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	油	47
CH ₂ OCH ₂ C≡N	105	71
CH ₂ OCH ₂ CH=CH ₂	油	45
CH ₂ OCH ₂ CH=CH-C ₆ H ₅	油	48
CH ₂ OCC(=O)Cl	油	42
CH ₂ OC(CH ₃) ₂ Cl	油	36
CH ₂ OSO ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₃	油	33
CH ₂ OSO ₂ -C ₆ H ₅	油	27
CH ₂ OSO ₂ CH ₃	123	42
CH ₂ OC(=O)NH-C ₆ H ₄ -Cl	160	42

【0013】

【表2】

(7)

<i>R</i>	11	12	收率(%)
	(7)	融点(℃)	
<chem>CH2OC(=S)Nc1ccc(Cl)cc1</chem>		89-90	42
<chem>CH2OC(=S)Nc1ccc(F)cc1</chem>		79-80	37
<chem>CH2OC(=S)NCH2CH=CH2</chem>		油	23
<chem>CH2OC(=S)Nc1ccc(C(F)(F)F)cc1</chem>		69-71	22
<chem>CONC1CCCC1</chem>		油	43
<chem>CONC1CCCC1N(C)C</chem>		93	43
<chem>CONEC1CCCC1C(F)(F)F</chem>		170-172	25
<chem>COOCH2CH2Cl</chem>		112	46
<chem>COOCH2CH=CH2</chem>		油	38
<chem>CH=CH-COOCH2CH2(cis)</chem>		油	54
<chem>CH=C(COOCH2CH2)2</chem>		油	22

【0014】

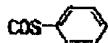
【表3】

13

R

14
融点(℃) 収率(%)

油 27



油 28



油 47



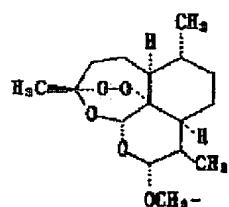
油 24



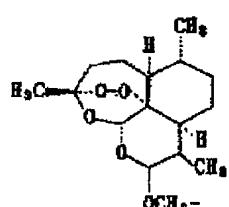
油 21



油 29



100 21



154-156 34

【0015】

【表4】

R	融点(℃)	収率(%)
<chem>CH3O-C6H4-Cl</chem>	150-152	72
<chem>CH3OCOR</chem>	84	55
<chem>CH3OCOOH</chem>	98-99	38
<chem>CH3OCO-C6H4-NO2</chem>	158-159	64
<chem>CH3OCNH-C6H5</chem>	81-82	44
<chem>CH3OC(=S)-C6H4-Cl</chem> <chem>COOC2H5</chem>	油	27

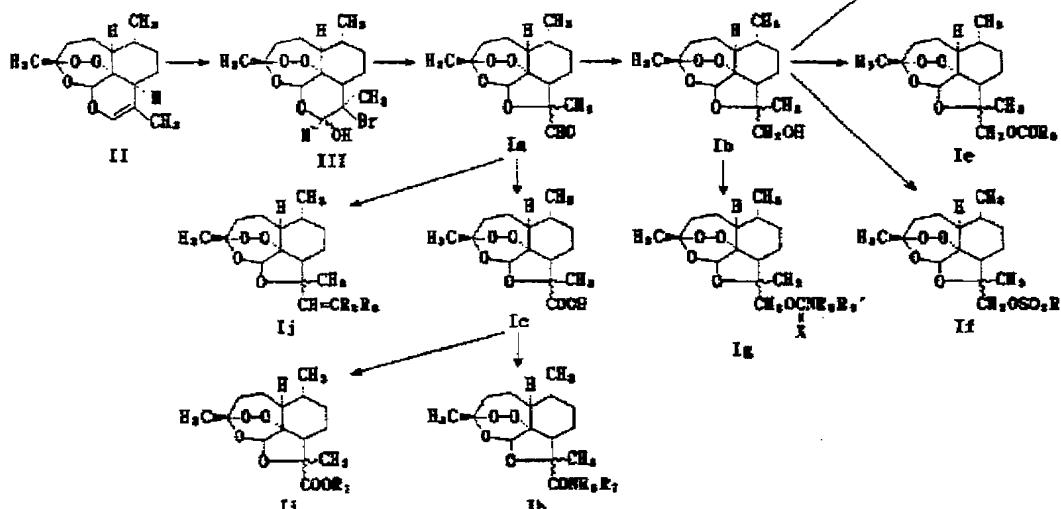
【0016】本発明の化合物を製造する方法は、スキーム1に記載した反応順序からなる。スキーム1において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_{50}

は、上述したと同じ意義を有す。

【0017】方法は、明細書に記載したように、溶媒として四塩化炭素のようなハロゲン化炭素を使用し

15

て、式IIの化合物 [J. Med. Chem. 1989, 32, 1 249~1252] に報告されているようにして製造した] を臭素化剤、好ましくは液体臭素で処理しそして好ましくは1時間攪拌し、それから水で反応を停止しそし*

スキーム1

【0019】式Iaの化合物は、有機溶媒、例えばクロロホルム、塩化メチレン、四塩化炭素のようなハロゲン化炭化水素を使用して、0~37℃の温度範囲、好ましくは27~30℃で、式IIIの化合物を有機塩基、好ましくは、例えばトリエチルアミン、ジエチルアミン、ベンジルアミンまたはジアザビシクロウンデセン、好ましくはジアザビシクロウンデセンで15~60分、好ましくは40~45分処理することからなる。次に、反応混合物を、真空中で濃縮しそして得られた残留物を、クロロホルムのような溶離剤を使用して、シリカゲルのような吸着剤上でクロマトグラフィー処理することにより精製して式Iaの化合物を得る。

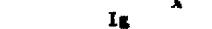
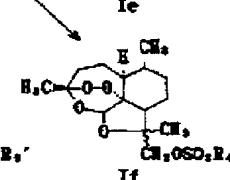
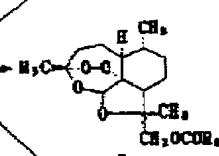
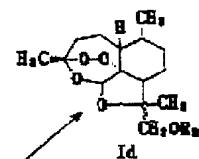
【0020】式Ibの化合物は、溶媒として、エタノール、メタノール、イソプロパノールのようなアルコール、好ましくはエタノールを使用して、0~30℃の温度範囲、好ましくは27~30℃で、好ましくは水素化ホウ素ナトリウムのような還元剤で15~60分、好ましくは30分処理することによって、式Iaの化合物から製造される。反応の完了後、混合物を、塩化アンモニウムの水溶液で処理しそしてそれから真空中で濃縮してエタノールを除去する。残留物を、酢酸エチル、クロロホルム、ジクロロメタンのような有機溶媒で抽出する。次に、有機層を分離し、水で洗浄し、硫酸ナトリウムのような乾燥剤上で乾燥し次に濃縮する。得られた残留物

*で次に有機層から式IIIの生成物を単離することからなる。

【0018】

【化15】

16



を、酢酸エチルおよびクロロホルムの混合物のような溶離剤を使用して、好ましくはシリカゲル上でクロマトグラフィー処理することにより精製して、式Ibの化合物を得る。

【0021】式Icの化合物は、水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウムのようなアルカリ性水溶液およびエタノール、メタノールのような有機水混和性溶媒、好ましくはエタノールの存在下において、0~45℃、好ましくは27~30℃の温度で、酸化剤、例えば好ましくは硝酸銀水溶液で1~6時間、好ましくは2時間処理することによって、式Iaの化合物から得られる。次に、反応混合物を濾過し、濃縮しそして残留物を、有機溶媒例えば酢酸エチルまたはクロロホルム、塩化メチレンのようなハロゲン化炭化水素で抽出する。水で洗浄した後、抽出液を硫酸ナトリウムのような乾燥剤上で乾燥しそして次に濃縮する。得られた残留物を、結晶化によりまたはクロマトグラフィー処理により精製して式Icの化合物を得る。

【0022】式Id [式中、R₂は、3α, 12α-エボキシ-3, 4, 5, 5aα, 6, 7, 8, 8aα, 9, 10, 12β, 12a-ドデカヒドロ-3β, 6α, 9β-トリメチルピラノ[4, 3-j][1, 2]ベンゾジオキセビン-10-イルを除いては上述した同じ意義を有す] の化合物は、好ましくは水素化ナトリウムのような塩基の存在

17

下において、ベンゼン、トルエンまたはジメチルホルムアミドのような無水の有機溶媒好ましくはジメチルホルムアミドおよび式 R_2X' （式中、 R_2 は上述したと同じ意義を有しそして X' は塩素または臭素のようなハロゲンを示す）のハライド中において、はじめに $0 \sim 30^\circ\text{C}$ 、好ましくは $0 \sim 5^\circ\text{C}$ の範囲の温度で $5 \sim 60$ 分、好ましくは $10 \sim 15$ 分そしてそれから 27°C の温度で $1 \sim 6$ 時間、好ましくは2時間アルキル化することによって、式I bの化合物から製造される。水でうすめた後、反応混合物を石油エーテル、クロロホルム、酢酸エチルのような有機溶媒で抽出しそして水および乾燥剤で処理した後、抽出液を濃縮しそして次にカラムクロマトグラフィー処理により精製する。しかしながら、 R_2 が塩基性基を有する化合物の場合においては、反応混合物を、酸塩基処理によって有機溶剤抽出液から精製され式I dの化合物が得られた。

【0023】式I d（式中、 R_2 は、 $3\alpha, 12\alpha$ -エボキシ- $3, 4, 5, 5a\alpha, 6, 7, 8, 8a\alpha, 9, 10, 12\beta, 12a$ -ドデカヒドロ- $3\beta, 6\alpha, 9\beta$ -トリメチルピラノ[4, 3-j] [1, 2]-ベンゾジオキセピン-10-イルを示す）の化合物は、また、好ましくは無水の塩化メチレンのような有機溶媒を使用して、三弗化硼素エーテレートのような触媒の存在下において 0°C でジヒドロアルテミシンで 1.5 分～ 1 時間処理することによって、式I bの化合物から製造される。生成物は、反応混合物を水で洗浄し、有機層を乾燥し、濾過しぬる液を真空濃縮することによって、反応混合物から単離される。最終の精製は、シリカゲルカラムを使用したカラムクロマトグラフィーにより実施し、 α および β -異性体を得る。

【0024】式I eの化合物は、好ましくはN, N-ジメチルアミノピリジン、トリエチルアミンまたはピリジンのような有機塩基、好ましくはN, N-ジメチルアミノピリジンの存在下において、クロロホルムまたはジクロロメタンのような有機溶媒中で、 $0 \sim 35^\circ\text{C}$ の温度範囲、好ましくは $27 \sim 30^\circ\text{C}$ で、式 R_3COCl （式中、 R_3 は上述したと同じ意義を有す）の酸塩化物で $1 \sim 6$ 時間、好ましくは3時間処理することによって、化合物I bから製造される。次に、反応混合物を、水でうすめ、石油エーテルのような有機溶媒で抽出しそして次に石油エーテル抽出液を稀塩酸次いで水で洗浄しそして無水の硫酸ナトリウム上で乾燥しそして次に濃縮する。残留物を、クロマトグラフィーにより精製して式I eの化合物を得る。

【0025】式I fの化合物は、好ましくはピリジン中において、 $50 \sim 120^\circ\text{C}$ の温度範囲、好ましくは $90 \sim 100^\circ\text{C}$ で、式 R_4SO_2Cl （式中、 R_4 は上述したと同じ意義を有す）の化合物で $1 \sim 6$ 時間、好ましくは3時間処理することによって、式I bの化合物から製造される。室温に冷却した後、反応混合物を水でうすめ次

18

いで酢酸エチルのような有機溶媒で抽出する。この酢酸エチル抽出液を、順次に、稀酢酸、水、水性重碳酸ナトリウムおよび水で洗浄しぬる液を硫酸ナトリウム上で乾燥しそして濾過後濃縮して残留物を得、この残留物をシリカゲル上のクロマトグラフィーにより精製して式I fの化合物を得る。

【0026】式I gの化合物は、有機塩基、例えばトリエチルアミン、ジエチルアミン、N, N'-ジメチルピリジン、またはピリジン、好ましくはピリジン中において、 $30 \sim 80^\circ\text{C}$ の温度範囲、好ましくは 60°C で、式 R_5NCX （式中、XはOまたはSを示しそして R_5 は上述したと同じ意義を有す）の化合物で $4 \sim 16$ 時間、好ましくは 14 時間処理することによって、化合物I bから製造される。反応混合物を、好ましくは、室温に冷却しそして水でうすめ次に石油エーテル、酢酸エチルまたはクロロホルムのような有機溶媒で抽出する。次に、有機層を分離し、氷冷稀塩酸次いで水で洗浄し、無水の硫酸ナトリウム上で乾燥しぬる液を真空下で濃縮して残留物を得る。この残留物を、シリカゲル上のクロマトグラフィーにより精製して式I gの化合物を得る。

【0027】式I h（式中、 R_6, R_7 は上述したと同じ意義を有す）の化合物は、好ましくは、はじめに酢酸エチルのような有機溶媒中において $0 \sim 30^\circ\text{C}$ の温度範囲、好ましくは $10 \sim 19^\circ\text{C}$ で塩化チオニルで 30 分処理しそして次に混合物を式 NR_6R_7 （式中、 R_6 および R_7 は上述したと同じ意義を有す）のアミンで処理することによって、化合物I cから得られる。反応混合物の温度を $60 \sim 70^\circ\text{C}$ に上昇させそして 30 分維持する。次に、反応混合物を室温に冷却し、水でうすめそして石油エーテルのような有機溶媒で抽出する。この有機抽出液を、水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥しぬる液を、これを熱ペンタンで反復抽出して式I hの化合物を得る。

【0028】式I i（式中、 R_1 は上述したと同じ意義を有す）の化合物は、好ましくは、乾燥酢酸エチル中で室温で塩化チオニルで 30 分処理しそして混合物を酢酸エチル中で $0 \sim 5^\circ\text{C}$ の温度でピリジンで 1.5 分処理しそしてそれから温度を $0 \sim 5^\circ\text{C}$ に維持しながらさらに 1 時間式 R_1OH （式中、 R_1 は上述したと同じ意義を有す）のアルコールで処理することによって、化合物I cから得られる。次に、反応混合物を、塩化メチレンのような有機溶媒で抽出しそして抽出液を水、稀塩酸および水で洗浄しそしてそれから硫酸ナトリウムのような乾燥剤上で乾燥した後濃縮する。得られた残留物を、シリカゲルのような吸着剤およびクロロホルム、酢酸エチルのような溶離剤を使用してフラッシュクロマトグラフィーにより精製して式I iの化合物を得る。

【0029】式I j（式中、 R_8 および R_9 はカルボエトキシを示す）の化合物は、好ましくは、式 $CH_2R_8R_9$ （式中、 R_8 および R_9 は上述した通りである）の化合

物、ビリジンおよびビペリジンの混合物で処理しそして得られた混合物を60～100℃、好ましくは80℃で10～24時間、好ましくは16時間加熱することによつて、化合物Iaから製造される。冷却した反応混合物を、稀塩酸で処理し、石油エーテルで抽出しそして有機抽出液を水で洗浄した後硫酸ナトリウム上で乾燥し、濃縮しそして次に得られた残留物を、シリカゲル上のクロマトグラフィーにより精製して式Ijの化合物を得る。

【0030】式Ij（式中、R₃は水素を示しそしてR₂は上述した意義を示す）の化合物は、好ましくは、室温で式P_h；P=C_{HR}₃（式中、R₃は上述したと同じ意義を有す）のホスホニウムイリドで2時間処理することにより化合物Iaから製造される。生成物は、水でうすめ次いでクロロホルムで抽出することによって単離されるクロロホルム抽出液を濃縮しそして得られた残留物を、溶離剤としてクロロホルムを使用して、シリカゲル上でフラッシュクロマトグラフィー処理することにより精製して式Ijの化合物を得る。

【0031】本発明の化合物は、ヒトのマラリアおよびウイルス感染の化学療法に大いに使用することができる。本発明の化合物は、けっし動物のマラリアのクロロキン感受性および耐性の両方の菌株に対して中程度から優秀な抗マラリア活性を示す。

【0032】式Iの化合物は、種々な方法で、好ましくは体重1kg当り2.5～100mgの範囲の投与量で経口的または非経口的に投与することができる。抗マラリア薬剤としては、それそれが活性物質100～400mgを含有する経口投与に対する糖剤またはカプセルまたは注射に対する溶液および懸濁液のような投与単位形態が好ましい。このような投与単位は、患者の状態によって、1回につき1回～3回投与される。

【0033】経口投与に当つては、特に、普通の担体、補助剤および（または）賦形剤、例えば澱粉、セルローズ粉末、タルカム、ステアリン酸マグネシウム、糖、ゼラチン、炭酸カルシウム、微細な珪酸、カルボキシメチルセルローズまたは同様な物質と一緒にした活性物質を含有する錠剤、糖剤、カプセル、粉剤または顆粒として使用することができる。

【0034】非経口投与に当つては、特に筋肉内注射に当つては、滅菌懸濁液、例えば、場合によつてはソルビタン脂肪酸エステルのような表面活性物質を同時に使用するようにして、胡麻油、植物油、ヒマシ油または合成トリグリセリドの使用により製造した油状懸濁液を使用することができる。さらに、例えば、場合によつては濃化剤、例えばポリエチレングリコールまたはカルボキシメチルセルローズを加えて、エトキシル化ソルビタン脂

肪酸エステルの使用により製造した水性懸濁液を使用することもできる。

【0035】生物学的評価方法

A. 抗マラリア活性

RaetherおよびFinkにより記載されている血液-裂虫撲滅活性度“28-日試験”〔W.H.O. Report on the Scientific Working Group on the Chemotherapy in Malaria, TDR/Chemal 3rd Review, 85.3, Geneva, 3-5 June 1985および該報告に含まれている文献〕の評価を実施した。

【0036】マウス：実験は、すべて、ポンペイ、ムランドのヘキスト インディア リミテッド繁殖ハウスから得られた不規則に繁殖した雄および雌のイスマウスにおいて実施した。動物は、球形エベリスロゾンに感染していない。動物に食物ペレットおよび水を自由に与えそして22～25℃の室温に維持する。

【0037】寄生虫：クロロキンに対して薬剤-感受性のけっし類住血胞子虫K-173菌株およびクロロキンに対して適度に耐性のけっし類住血胞子虫（NS）を、

20 the London School of Hygiene and Tropical Medicines から得た。これらの菌株は、腹腔内にまたは静脈内に接種した場合に、感染後6～7日の間で、マウス1匹当たり寄生虫感染赤血球1×10⁷の致死感染を生ずる。

【0038】化合物の投与：化合物は、RaetherおよびFinkにより記載されている方法〔W.H.O. Report of the Scientific Working Group on the Chemotherapy in Malaria, TDR/Chemal 3rd Review, 85.3, Geneva, 3-5 June 1985および該報告に含まれている文献〕により経口的または皮下的に投与する。

30 【0039】本発明の化合物は、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート〔英國のシグマチャニアロの（[®]）トゥィーン-80〕の1または2滴と一緒に二重に精製されたカルジ油または落花生油またはトウモロコシ油中で均質化しそしてこのような懸濁液をマウスにおける皮下接種に対して使用する。薬剤は、5日間投与された。はじめの投与は感染の2時間以内（D+0）に行いついでD+1、D+2、D+3およびD+4に行う。

【0040】処理したマウスの観察：血液塗抹標本を、種々な間隔でD+4から準備しそしてD+28までづける。血液塗抹標本は、尾の末端から取出しそしてギーグマサで染色する。D+28でけっし類住血胞子虫に感染していないマウスは、完全に治ゆしたとみなす。

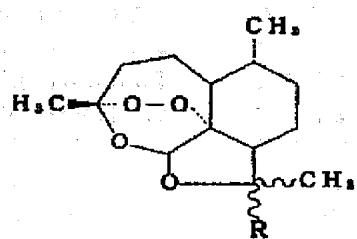
【0041】本発明の式Iの化合物を使用して得られた結果は、表5～6に示す通りである。

【0042】

【表5】

(12)

21



22

R	投与量 mg/kg × 5	投与 方法	活性度	
			D+7	D+28
CHO	25	s.c.	4/4	4/4
CH ₂ OCH ₂ C≡CH	10	s.c.	6/6	2/6
CH ₂ OCH ₂ CH=CH ₂	5	s.c.	6/6	6/6
CH ₂ OSO ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₃	5	s.c.	5/6	1/6
CH ₂ OCH ₂ -C ₆ H ₄ -Cl	5	s.c.	12/12	12/12
	2.5	s.c.	6/6	3/6
	25	p.o.	6/6	6/6
	5	s.c.	5/5	6/6 ^b
	2.5	s.c.	5/5	2/5 ^b
	25	p.o.	5/6	5/5 ^b
CH ₂ OCH ₂ -C ₆ H ₄ -F	5	s.c.	6/6	6/6

【0043】

30 【表6】

R	投与量 mg/kg × 5	投与 方法	活性度	
			D+7	D+28
	2.5	s.c.	12/12	12/12
	1.25	s.c.	11/11	9/11
	25	p.o.	6/6	5/6
	5.0	s.c.	6/6	8/8 ^b
	2.5	s.c.	6/6	7/8 ^b
	5	s.c.	5/5	5/5
	2.5	s.c.	5/5	5/5
	25	p.o.	6/6	
	5	s.c.	6/6 ^b	
	2.5	s.c.	6/6 ^b	

【0044】化合物に対して記載した活性度は、すべて、クロロキン感受性の菌株（けっし類住血孢子虫X-173）に対するものである。但し、*印を有する活性度は、クロロキン耐性菌株に対するものである。

【0045】B. 抗ウイルス活性

滅菌ダルベコ緩衝生理食塩水(Dulbecco's buffer saline)で稀釈(1:50)された予め感染したマウスの血清から集めたフレンド白血病ウイルスを使用して、静脈内または腹腔内投与方法により、スイスマウス(体重25g)に感染させる。

【0046】化合物は、皮下的または筋肉内的または経口的または腹腔内の投与方法により投与される。処理は、感染の2日前に開始しそして感染後8日以上つづける。薬剤投与を終了した後、2日後に剖検を行う。

【0047】化合物は、マウスにおけるフレンド白血病ウイルス感染に対して試験しそして10日間1~5mg/マウス/日の投与量で活性度を示す。感染した未処理の比較対照動物と比較した脾重量の減少を活性度とみなす。結果は、このような化合物がヒトにおけるヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対して活性であることを示す。

【0048】以下の実施例は、本発明の例示であって、本発明の範囲を限定するものではない。

【0049】実施例 1

$3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5a α , 6, 7, 8, 8a α , 9, 10, 12 β , 12a-ドデカヒドロ-9-ブロモ-10-ヒドロキシ-3 β , 6 α , 9-トリメチルビラノ[4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン

四塩化炭素(100ml)中の $3\alpha, 12\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5a α , 6, 7, 8, 8a α , 12 β , 12a-デカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルビラノ[4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-9-エン(1.0g)の溶液に、水(0.5ml)を加える。この攪拌溶液に、液体臭素を、淡い臭素の色が持続されるまで毛管で滴加する。反応混合物を、さらに1時間攪拌する。反応混合物を四塩化炭素(100ml)でうすめ、水で洗浄し、乾燥(Na_2SO_4)し後に溶媒を真空中で除去する。得られた固体を、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製する。酢酸エチル/クロロホルムで溶離し、溶離液の濃縮後、生成物を得る。融点124~125°C(d)。収率79%。

【0050】実施例 2

$3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5a α , 6, 7, 8, 8a, 9, 11, 11a-ウンデカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルビラノ[3, 4-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-9-カルボキシアルデヒド

クロロホルム(5ml)中の $3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5a α , 6, 7, 8, 8a α , 9, 10, 12 β , 12a-ドデカヒドロ-9-ブロモ-10-ヒドロキシ-3 β , 6 α , 9-トリメチルビラノ[4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-9-カルボキシアルデヒド

ベンゾジオキセピン(0.19g)の溶液に、ジアザビシクロウンデセン(DBU, 0.2ml)を、室温で加えられた。反応混合物を45分攪拌し、それから溶剤を真空中で除去しそして残留物を、溶離剤としてクロロホルムを使用して、シリカゲル上のクロマトグラフィーにより精製して、はじめの数フラクションにおいて標記生成物0.13gを得る。融点100°C。収率85%。

【0051】実施例 3

$3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5a α , 6, 7, 8, 8a, 9, 11, 11a-ウンデカヒドロ-9-ヒドロキシメチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルビラノ[3, 4-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン

エタノール(60ml)中の $3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5a α , 6, 7, 8, 8a, 9, 11, 11a-ウンデカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルビラノ[3, 4-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-9-カルボキシアルデヒド(1.0g)の溶液に、水素化ホウ素ナトリウム(0.1g)が加えられた。反応混合物を30分攪拌する。次に、水性塩化アンモニウムを加えて NaBH_4 の過剰を分解する。エタノールを真空中で除去しそして生成物をジクロロメタン(3×25ml)で抽出する。

合したジクロロメタン抽出液を水、水性塩化ナトリウムで洗浄し、乾燥(Na_2SO_4)し後に溶媒を除去する。生成物を、溶離剤としてクロロホルム中の8%酢酸エチルを使用して、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、生成物を得る。融点135~136°C。収率72%。

【0052】実施例 4

$3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5a α , 6, 7, 8, 8a, 9, 11, 11a-ウンデカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルビラノ[3, 4-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-9-カルボン酸

エタノール(5ml)中の $3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5a α , 6, 7, 8, 8a, 9, 11, 11a-ウンデカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルビラノ[3, 4-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-9-カルボキシアルデヒド(0.9g)の攪拌溶液に、水(3.0ml)中の硝酸銀(1.8g)の溶液を加える。この攪拌反応混合物に、水(2.0ml)中の水酸化ナトリウム(0.4g)の溶液を滴加する。

反応混合物を、さらに室温で2時間攪拌する。次に、残留物を濾過しそして水性アルコール5.0mlで洗浄する。アルコールを、合体した濾液から真空中で除去する。水性層を水でうすめそしてクロロホルム(2×10ml)で抽出する。次に、水性層を酢酸で酸性にする。酸性にした層の抽出次いで抽出液の濃縮およびイソプロピルエーテル-石油エーテルからの結晶化によって、標記生成物を得る。0.72g(75.79%)。融点166~167°C。

【0053】実施例 5

$3\alpha, 11\alpha$ -エポキシ-3, 4, 5, 5a α , 6, 7, 8, 8a, 9-トリメチルビラノ[3, 4-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-9-カルボン酸

25

a, 9, 11, 11 a-ウンデカヒドロ-9-(2-ブロピノキシ)メチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ[3, 4-j] [1, 2]ベンゾジオキセピン
DMF (0.5 ml) 中の NaH (20 mg) の攪拌氷冷懸濁液に、臭化プロパルギル (0.1 ml) および 3 α , 11 α -エボキシー-3, 4, 5, 5 a α , 6, 7, 8, 8 a, 9-トリメチルフラノ (3, 4-j) [1, 2]ベンゾジオキセピン (60 mg) を加える。反応混合物を、徐々に室温にしそして2時間攪拌する。次に、水を反応混合物に加えそして生成物を石油エーテル (60 ~ 80°C) で抽出する。生成物を、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製する。融点 105°C。収率 71%。臭化プロパルギルの代りに適当なハログン化物を使用して、同様にして次の化合物を製造する。

【0054】3 α , 11 α -エボキシー-3, 4, 5, 5 a α , 6, 7, 8, 8 a, 9, 11, 11 a-ウンデカヒドロ-9-(N,N-ジエチルアミノエトキシ)-メチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4-j] [1, 2]ベンゾジオキセピン。油。収率 47%。

【0055】3 α , 11 α -エボキシー-3, 4, 5, 5 a α , 6, 7, 8, 8 a, 9, 11, 11 a-ウンデカヒドロ-9-(2-ブロペノキシ)メチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4-j] [1, 2]ベンゾジオキセピン。油。収率 45%。

【0056】3 α , 11 α -エボキシー-3, 4, 5, 5 a α , 6, 7, 8, 8 a, 9, 11, 11 a-ウンデカヒドロ-9-(3-フェニル-2-ブロペニルオキシ)メチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4-j] [1, 2]ベンゾジオキセピン。油。収率 42%。

【0057】実施例 6

3 α , 11 α -エボキシー-3, 4, 5, 5 a α , 6, 7, 8, 8 a, 9, 11, 11 a-ウンデカヒドロ-9-(クロロアセトキシ)メチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4-j] [1, 2]ベンゾジオキセピン

室温のクロロホルム中のジメチルアミノビリジン (DAMP) (0.1 g) の攪拌溶液に、塩化クロロアセチル (0.1 ml) を加える。得られた混合物を 20 分攪拌しそしてそれから、3 α , 11 α -エボキシー-3, 4, 5, 5 a α , 6, 7, 8, 8 a, 9, 11, 11 a-ウンデカヒドロ-9-ヒドロキシメチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4-j] [1, 2]ベンゾジオキセピン (0.07 g) を加える。反応混合物を、さらに 3 時間攪拌する。水を反応混合物に加えそして生成物を石油エーテルで抽出する。石油エーテル抽出液を稀 HCl、水で洗浄し、乾燥 (Na₂SO₄) し後に溶媒を除去する。シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製して生成物を油として得る。収率 42%。

【0058】塩化クロロアセチルの代りに適当な酸クロ

10

20

30

40

50

26

ライドを使用して、同様にして次の化合物を製造する。

【0059】3 α , 11 α -エボキシー-3, 4, 5, 5 a α , 6, 7, 8, 8 a, 9, 11, 11 a-ウンデカヒドロ-9-(4-クロロブチリルオキシ)メチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4-j] [1, 2]ベンゾジオキセピン。油。収率 35%。

【0060】実施例 7

3 α , 11 α -エボキシー-3, 4, 5, 5 a α , 6, 7, 8, 8 a, 9, 11, 11 a-ウンデカヒドロ-9-メチルスルホニルオキシメチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4-j] [1, 2]ベンゾジオキセピンの製造
ビリジン (0.3 ml) 中の 3 α , 11 α -エボキシー-3, 4, 5, 5 a α , 6, 7, 8, 8 a, 9, 11, 11 a-ウンデカヒドロ-9-ヒドロキシメチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4-j] [1, 2]ベンゾジオキセピン (0.06 g) およびメタンスルホニルクロライド (0.1 ml) の混合物を、90 ~ 100°C で 3 時間加熱する。

次に、反応混合物を冷却し、水でうすめそして生成物を酢酸エチルで抽出する。この酢酸エチル抽出液を、稀酢酸、水、水性重炭酸ナトリウム、水で洗浄し、乾燥 (Na₂SO₄) し後に溶媒を除去して油を得る。生成物を、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製する。

【0061】メチルスルホニルクロライドの代りに適当なスルホニルクロライドを使用して、同様にして次のスルホネートエステルを製造する。

【0062】3 α , 11 α -エボキシー-3, 4, 5, 5 a α , 6, 7, 8, 8 a, 9, 11, 11 a-ウンデカヒドロ-9-(p-トルエンスルホニルオキシ)メチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4-j] [1, 2]ベンゾジオキセピン。油。収率 33%。

【0063】3 α , 11 α -エボキシー-3, 4, 5, 5 a α , 6, 7, 8, 8 a, 9, 11, 11 a-ウンデカヒドロ-9-(フェニルスルホニルオキシ)メチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4-j] [1, 2]ベンゾジオキセピン。油。収率 27%。

【0064】実施例 8

3 α , 11 α -エボキシー-3, 4, 5, 5 a α , 6, 7, 8, 8 a, 9, 11, 11 a-ウンデカヒドロ-9-(4-クロロフェニルアミノチオカルボニルオキシ)メチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4-j] [1, 2]ベンゾジオキセピン

ビリジン中の 3 α , 11 α -エボキシー-3, 4, 5, 5 a α , 6, 7, 8, 8 a, 9, 11, 11 a-ウンデカヒドロ-9-ヒドロキシメチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4-j] [1, 2]ベンゾジオキセピン (0.1 g) および 4-クロロフェニルイソチオシアネート (0.15 g) の混合物を、60°C で 14 時間加熱する。それから、反応混合物を冷却し、水でうすめそして石油エーテル (60 ~ 80°C) で抽出する。合した抽出

27

液を稀氷冷HCl、水で洗浄し、乾燥(Na₂SO₄)し次に溶媒を除去する。生成物を、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製する。融点89~90℃。収率65%。

【0065】同様に、4-クロロフェニルイソチオシアネットの代りに適当なイソシアネットまたはイソチオシアネットを使用して、次の化合物を製造する。

【0066】3α,11α-エポキシ-3,4,5,5α,6,7,8,8a,11,11a-ウンデカヒドロ-9-(4-クロロフェニルアミノカルボニルオキシ)メチル-3β,6α,9-トリメチルフラノ〔3,4-j〕〔1,2〕ベンゾジオキセピン。融点160℃。収率42%。

【0067】3α,11α-エポキシ-3,4,5,5α,6,7,8,8a,11,11a-ウンデカヒドロ-9-(4-フルオロフェニルアミノチオカルボニルオキシメチル)-3β,6α,9-トリメチルフラノ〔3,4-j〕〔1,2〕ベンゾジオキセピン。融点79~80℃。収率37%。

【0068】3α,11α-エポキシ-3,4,5,5α,6,7,8,8a,11,11a-ウンデカヒドロ-9-(2-プロペニルアミノチオカルボニルオキシメチル)-3β,6α,9-トリメチルフラノ〔3,4-j〕〔1,2〕ベンゾジオキセピン。油。収率23%。

【0069】実施例 9

3α,11α-エポキシ-3,4,5,5α,6,7,8,8a,11,11a-ウンデカヒドロ-9-(4-トリフルオロメチルフェニルメチルアミノカルボキシアミド)-3β,6α,9-トリメチルフラノ〔3,4-j〕〔1,2〕ベンゾジオキセピンの製造

乾燥酢酸エチル(2.5ml)中の3α,11α-エポキシ-3,4,5,5α,6,7,8,8a,11,11a-ウンデカヒドロ-3β,6α,9-トリメチルフラノ〔3,4-j〕〔1,2〕ベンゾジオキセピン-9-カルボン酸(0.07g)の攪拌溶液に、塩化チオニル(0.1ml)を滴加する。反応混合物を30分攪拌しそしてそれから乾燥酢酸エチル(2ml)中の4-トリフルオロメチルベンジルアミン(0.2ml)の溶液を、氷-水浴中で冷却しながら加える。反応混合物を、60~70℃でさらに30分攪拌する。水を加え、生成物を石油エーテル(60~80)で抽出する。合体した抽出液を、水で反復して洗浄し、乾燥しそして溶媒を除去する。得られた残留物を、熱n-ペンタンで反復抽出して生成物アミドを得る。融点170~172℃。収率25%。

【0070】同様にして、4-トリフルオロメチルベンジルアミンの代りに適当なアミンを使用して、次のアミドを製造する。

【0071】3α,11α-エポキシ-3,4,5,5α,6,7,8,8a,9,11,11a-ウンデカヒドロ-9-(N-モルホリノイル)-3β,6α,9-トリメチルフラノ〔3,4-j〕〔1,2〕ベンゾジオキセピン。

28

油。収率43%。

【0072】3α,11α-エポキシ-3,4,5,5α,6,7,8,8a,9,11,11a-ウンデカヒドロ-9-(N-メチルビペラジノイル)-3β,6α,9-トリメチルフラノ〔3,4-j〕〔1,2〕ベンゾジオキセピン。融点93℃。収率43%。

【0073】実施例 10

2-クロロエチル3α,11α-エポキシ-3,4,5,5α,6,7,8,8a,9,11,11a-ウンデカヒドロ-3β,6α,9-トリメチルフラノ〔3,4-j〕〔1,2〕ベンゾジオキセピン-9-カルボキシレートの製造
乾燥酢酸エチル(2ml)中の3α,11α-エポキシ-3,4,5,5α,6,7,8,8a,9,11,11a-ウンデカヒドロ-3β,6α,9-トリメチルフラノ〔3,4-j〕〔1,2〕ベンゾジオキセピン-9-カルボン酸(0.05g)の攪拌溶液に、塩化チオニル(0.1ml)を滴加する。反応混合物を30分攪拌しそしてそれから乾燥酢酸エチル中のビリジン(0.2ml)の溶液を冷却しながら加える。反応混合物を15分攪拌しそしてそれから2-クロロエタノール(0.2ml)を加える。反応混合物をさらに1時間攪拌し、水を加えそして生成物をジクロロメタンで抽出する。この抽出液を水、冷稀HCl、水で洗浄し、乾燥(Na₂SO₄)し次に溶媒を除去する。生成物を、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製する。融点112℃。収率46%。

【0074】同様にして、2-クロロエタノールの代りに適当なアルコールを使用して、次のエステルを製造する。

【0075】2-プロペニル3α,11α-エポキシ-3,4,5,5α,6,7,8,8a,9,11,11a-ウンデカヒドロ-3β,6α,9-トリメチルフラノ〔3,4-j〕〔1,2〕ベンゾジオキセピン-9-カルボキシレート。油。収率38%。

【0076】2-プロモエチル3α,11α-エポキシ-3,4,5,5α,6,7,8,8a,9,11,11a-ウンデカヒドロ-3β,6α,9-トリメチルフラノ〔3,4-j〕〔1,2〕ベンゾジオキセピン-9-カルボキシレート。油。収率47%。

【0077】3-クロロプロピル3α,11α-エポキシ-3,4,5,5α,6,7,8,8a,9,11,11a-ウンデカヒドロ-3β,6α,9-トリメチルフラノ〔3,4-j〕〔1,2〕ベンゾジオキセピン-9-カルボキシレート。油。収率24%。

【0078】エチル3α,11α-エポキシ-3,4,5,5α,6,7,8,8a,9,11,11a-ウンデカヒドロ-3β,6α,9-トリメチルフラノ〔3,4-j〕〔1,2〕ベンゾジオキセピン-9-カルボキシレート。油。収率29%。

【0079】8-クロロオクチル3α,11α-エポキシ-3,4,5,5α,6,7,8,8a,9,11,11a-

ウンデカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4- β] [1, 2] ベンゾジオキセピン-9-カルボキシレート。油。収率21%。

【0080】実施例 11

1-(3 α , 11 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 $\alpha\alpha$, 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11a-ウンデカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4- β] [1, 2] ベンゾジオキセピン-9-イル) -2, 2'-ジカルボエトキシエチレンの製造
3 α , 11 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 $\alpha\alpha$, 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11a-ウンデカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4- β] [1, 2] ベンゾジオキセピン-9-カルボクスアルデヒド (0.08g)、マロン酸ジエチル (0.3ml) およびビペリジン (1.0ml) の混合物を、攪拌しながら80°Cで16時間加熱する。反応混合物を冷却し、稀HClで処理しそしてそれから石油エーテル (60~80) で抽出する。この抽出液を、水で洗浄し、乾燥 (Na_2SO_4) しそして溶媒を除去する。残留物をシリカゲル上でフラッシュクロマトグラフィー処理して、油として標記化合物を得る。収率22%。

【0081】実施例 12

3 α , 11 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 $\alpha\alpha$, 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11a-ウンデカヒドロ-9-(シス-4-トリフルオロメチルスチリル)-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4- β] [1, 2] ベンゾジオキセピンの製造

乾燥テトラヒドロフラン (2ml) 中のトリフェニルp-トリフルオロメチルベンジルホスホニウムプロマイド (0.18g) の攪拌溶液に、水素化ナトリウム (0.03g) を加える。反応混合物を室温で30分攪拌する。次に、3 α , 11 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 $\alpha\alpha$, 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11a-ウンデカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4- β] [1, 2] ベンゾジオキセピン-9-カルボキシアルデヒド (5)(0.09g) を、上記のホスホニウムイリドに加えそして反応混合物をさらに2時間攪拌する。次に、水を反応混合物に加えそして生成物をクロロホルムで抽出する。クロロホルム抽出液の濃縮からの残留物を、溶離剤としてクロロホルムを使用して、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーにより精製する。はじめに、9%の収率でトランス生成物が得られる。さらに、溶離によって、シス生成物が26%の収率で得られる。

【0082】同様に、トリフェニルp-トリフルオロメチルベンジルホスホニウムプロマイドの代りにトリエチルホスホノアセテートを使用して上述した条件によつて、化合物シス-1-(3 α , 11 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 $\alpha\alpha$, 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11a-ウンデカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4-

- β] [1, 2] ベンゾジオキセピン-9-イル) -2-カルボエトキシエチレンが油として得られる。収率54%。

【0083】実施例 13

3 α , 12 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 $\alpha\alpha$, 6, 7, 8, 8 $\alpha\alpha$, 9, 10, 12 β , 12a-ウンデカヒドロ-10 α -[3 α , 11 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 $\alpha\alpha$, 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11a-ウンデカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4- β] [1, 2] ベンゾジオキセピン-9-メチレン]-オキシ-3 β , 6 α , 9 β -トリメチルビラノ [4, 3- β] [1, 2] ベンゾジオキセピンの製造

乾燥塩化メチレン (70.0ml) 中のジヒドロアルテミシン (0.490g, 1.70ミリモル) および3 α , 11 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 $\alpha\alpha$, 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11a-ウンデカヒドロ-9-ヒドロキシメチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4- β] [1, 2] ベンゾジオキセピン (0.350g, 1.23ミリモル) の溶液に、三弗化硼素エーテレート (0.2ml) を0°Cで滴加する。反応混合物を、15分攪拌しそしてそれから水で洗浄する。有機層を分離し、乾燥し、濃過し後に濁液を濃縮する。濃縮後得られた残留物を、シリカゲルカラムを使用したフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、生成物を得る。融点100°C。収率21%。

【0084】実施例 14

3 α , 12 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 $\alpha\alpha$, 6, 7, 8, 8 $\alpha\alpha$, 9, 10, 12 β , 12a-ドデカヒドロ-10 β -[3 α , 11 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 $\alpha\alpha$, 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11a-ウンデカヒドロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4- β] [1, 2] ベンゾジオキセピン-9-メチレン] オキシ-3 β , 6 α , 9 β -トリメチルビラノ [4, 3- β] [1, 2] ベンゾジオキセピンの製造

乾燥塩化メチレン (70.0ml) 中のジヒドロアルテミシン (0.490g, 1.70ミリモル) および3 α , 11 α -エポキシ-3, 4, 5, 5 $\alpha\alpha$, 6, 7, 8, 8 α , 9, 11, 11a-ウンデカヒドロ-9-ヒドロキシメチル-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4- β] [1, 2] ベンゾジオキセピン (0.350g, 1.23ミリモル) の溶液に、三弗化硼素エーテレート (0.2ml) を、0°Cで滴加する。反応混合物を15分攪拌しそしてそれから水で洗浄する。有機層を分離し、乾燥し、濃過し後に濁液を濃縮する。濃縮後得られた残留物を、シリカゲルカラムを使用したフラッシュクロマトグラフィーにより精製する。はじめの α -異性体の数フラクションをする。さらに溶離により標記化合物を含有するフラクションを得る。融点154~156°Cの純粋な生成物を得る。収率34%。

フロントページの続き

(72) 発明者 ブラビン・ジャヤント・カルニク
インド国セイン400061. プリンダバンソサ
イエティ. フラツトナンバー23. ピルディ
ングナンバー22/エイ

(72) 発明者 バンシ・ラル
インド国ポンベイ400080. ムランド/ウエ
スト. アドバニアパートメンツ 30エイ

(72) 発明者 デイーパク・クマル・チャタジー
インド国ポンベイ400081. ムランド/イー
スト. マハトマプールロード. シエータル
ブンガロウ ナンバー2

(72) 発明者 スプラマニ・ナトラジヤン・アイエル
インド国ポンベイ400080. ムランド/ウエ
スト. ナフル. アショクナガル. アムラツ
チヤヤ エイ/4

(72) 発明者 ユルゲン・ブルームバハ
インド国ポンベイ400006. ネビーアンシー
ロード66

(54) 【発明の名称】 3 α , 11 α -エボキシ-3, 4, 5, 5a α , 6, 7, 8, 8a, 9, 11, 11a-ウンデカヒド
ロ-3 β , 6 α , 9-トリメチルフラノ [3, 4-j] [1, 2]-ベンゾジオキセピンの9-
置換化合物

弓用非特許文献

5

特許出願の番号 特願 2004-550230
作成日 平成22年 2月19日
作成者 渕野 留香 4042 4P00
発明の名称 C型肝炎、牛ウイルス性下痢症及び豚コレラウイルスを含むラビウイルス科ウイルスにより生起される感染症の治療のためのエンドペルオキシド類の使用

本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。
取扱にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

424 第8章 ウィルス学各論

らいである。この接種法では、幼児・学童の流行を抑制できず、ワクチン接種者(生ワクチン接種後の抗体価はあまり高くない)への再感染を阻止できないが、その場合も抗体価に顕著な上昇(ブースター効果)がみられるだけで、胎児に影響はない。

D. フラビウイルスと感染症

フラビウイルス科 Flaviviridae のウイルスは、トガウイルス科のアルファウイルスや他のウイルスとともに、節足動物媒介性ウイルス(アルボウイルス, arbovirus)である。蚊が主な媒介者 vector であるが、ダニの場合もある。これらの吸血性昆虫は、単にウイルスを物理的に運ぶのではなく、自己の体内で特定のウイルスの増殖を許すが、自身は発病せずウイルスをもち続ける。さらに、脊椎動物を吸血することによりウイルスの新たな増殖を促し、自然界でのアルボウイルス存続を支える。

1. フラビウイルスの性状

フラビウイルス flavivirus は、トガウイルスよりやや小型の、径 40~50 nm の球形でエンベロープをもち、糖タンパクのスパイクに血球凝集能がある。核酸も 1 本のプラス鎖 RNA なので、トガウイルスとよく似ているが、フラビのエンベロープタンパクは 1 種類に対しトガは 2~3 種類、さらにゲノムの構成や増殖様式に違いがあることなどから、トガとは別の科とされる。

2. フラビウイルス感染症

この科の、ヒトに病原性のあるウイルスには黄

熱ウイルスを代表 (flavi: 黄色、ラテン語) としてデングウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスなどがあるが、ここでは前 3 者につき記載する。

a. 黄熱ウイルス yellow fever virus

アフリカ、中・南米に分布し日本人にはなじみが薄いが、ヨーロッパ人は、これらの地域に入る度に多くの人命を失ってきた歴史がある。1901 年、W. Reed らがウイルスを分離し、媒介蚊も決定した。最初のヒト病原性ウイルスの発見である。このウイルスには、森林型(サル-蚊-ヒト)と都市型(ヒト-蚊-ヒト)の二つの感染環がある。

1) 臨床症状

病像は、発熱や頭痛ですむ軽症から、黄疸(肝炎)、出血(吐血、下血)、タンパク尿・乏尿(腎炎)、脳症まで幅広く、最も多いのは肝炎を主因とする症状である(黄色: 黄疸)。肝炎と腎炎が併発すると予後は良くない。

2) 実験室内診断法

第 3 病日ごろまで、血液からのウイルス分離が可能である。マウス脳内または培養細胞へ接種する。血清学的診断は、急性期と回復期の血清を用い、中和試験や血球凝集抑制試験により抗体価の有意な上昇を証明する。

3) 予防対策

黄熱に対する有効な治療法がなく、予防が重要。有効性が証明されている優れた弱毒生ワクチン(17D 株など)が世界的に使用されている。黄熱ウイルスが存在する地域に入る場合、ワクチン接種が必要である。1 回接種で 10 年間有効とされている。

b. デングウイルス dengue virus

デングウイルスは、ヒト-蚊-ヒトの感染環で流行を起こす。1940 年代までは、デング熱 dengue fever (DF) と呼ばれる軽症の感染症として知られていたが、1950 年代から出血熱の病像をとる流行が、タイやフィリピンで繰り返し起こり、これもデングウイルスによることが明らかにされた。

ショックにより死亡する例もあり、前者がデン

本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。
取扱にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

I. RNA型ウイルス 425

グ出血熱 dengue hemorrhagic fever (DHF), 後者が、 Dengue Shock syndrome (DSS) として確立された。DF と DHF/DSS との発病病理の違いについては、ウイルスの毒性の強弱によるという説と、免疫病理学的反応(異なる血清型のデングウイルスの再感染)によるとする説があるが、①4 血清型がすべて存在する地域に DHF/DSS が多い、②DHF/DSS 患者の 90%以上が二次免疫応答を示す、③再感染者血清中に、デングウイルスの感染能を増強する抗体が存在することから、免疫病理学的発病病理説が有力である。この説は、後述するようにワクチン開発の考え方方に影響を与える。

1) 臨床症状

デング熱 (DF) は発熱、頭痛、関節痛、発疹程度で回復するが、出血熱 (DHF) では出血傾向が増し、皮下出血や消化管粘膜からの出血があり(血小板数の減少がみられる)、さらに毛細血管の透過性が増大すると、血液成分の漏出がひどくなり(ヘマトクリット値が上昇)、循環血液量減少性ショックを起こす (DSS)。輸液・輸血を主とする抗ショック療法は、かなり有効である。

2) 実験室診断法

第 3 ~ 5 病日ごろに血液からウイルス分離が可能。ヒトスジシマカの培養細胞 (C6/36) は、マウス脳より分離効率が良い。最近、ウイルス分離によらず感染ウイルスの血清型を決定することができる PCR 法が確立された。

血清学的診断では、デング初感染例は血球凝集抑制試験や ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) によっても感染ウイルスの血清型を判定できるが、再感染例では中和試験によっても交叉反応のため、血清型決定が困難な場合が多い。デングウイルス特異的 IgM 抗体を検出する ELISA も開発されており有用である。

3) 予防対策

前述の免疫病理学的発病病理説によると、ある血清型に対してのみ免疫を与えると、かえって DHF/DSS を起こす危険がある。4 型すべての生ワクチンを開発するのはかなり困難で、当面デングワクチンが一般に使用できるようになる見込み

は少ない。流行地では、媒介蚊(主にネッタイシマカ)の駆除を住民参加により実施する方法が奨励されている。

c. 日本脳炎ウイルス Japanese encephalitis virus

日本脳炎ウイルスは、日本人研究者によって発見された数少ないウイルスの一つで、媒介蚊の決定も日本人によってなされた。このウイルスの主な感染環は、ブタ-蚊-ブタであり、ブタでは妊娠ブタに死・流産があるが他に影響がなく、3~5 日持続するウイルス血症を起こす。このブタを吸血した蚊(コガタアカイエカ)は中腸で増殖したウイルスを唾液腺に蓄積し、新たな感受性ブタにウイルスを伝播する。たまたまウイルス保有蚊がヒトを吸血し、感染が起こる。

1960 年代中ごろまでは、日本脳炎流行はもっぱら東アジアでみられたが、1960 年代末から 1970 年代にかけて、東南アジア(タイやベトナム)から南アジア(インド、ネパール、スリランカ)へ広がった。これらの地域では第二次大戦後、社会・経済的状況が変化し、水田耕作面積の拡大とタンパク源としての飼育豚の増加が進み、これまで散発的にしかなかった日本脳炎が流行の形をとったと考えられる。わが国では、1960 年代末から患者数が激減した。ワクチンの普及、水田面積の減少と農薬散布、養豚業の規模拡大と住宅地域からの隔離などの複合要因によると思われる。

1) 臨床症状

顎性感染率は、1~3 人/1,000 人程度、ほとんど不顎性感染で終わる。しかし、発病すると治癒するのは約 1/3、死亡が 1/3、後遺症を伴うものが 1/3 くらいという厳しい脳炎であり、後遺症は運動麻痺、知能低下、言語障害などがある。

突然の高熱で発症し、強い頭痛、恶心、嘔吐など髄膜刺激症状が先行し、重症例では、比較的早期から中枢神経症状(意識障害、昏睡状態、不随意運動、痙攣、病的反射など)が現れる。高熱は 7~10 日で下がる。

2) 実験室内診断法

血液からのウイルス分離は、きわめて困難であ

本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。
取扱にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

る。死亡例では、脳材料乳剤の遠心上清をヒトスジシマカ培養細胞(C6/36)、または乳のみマウス脳内へ接種する。脳材料中のウィルス抗原を蛍光抗体法などで証明することも可能である。

血清学的診断では、急性期と回復期の血清を用い、血球凝集抑制試験あるいはELISAにより、抗体価の有意な上昇を証明する。脳脊髄液中の特異的IgM抗体は、血清中のそれよりも長期にわたり検出可能である。

3) 予防対策

治療は、対症療法しかなく予防が大切。わが国では、高度に精製されたマウス脳由来不活化ワクチンが30年以上使用されている。日本製ワクチンは優秀性が広く認められており、副作用や有効性に問題はないが、精製にかかる費用から高価になり、東南アジアや南アジアの発展途上国では、このワクチンの大量接種が難しい。

日本全国での日本脳炎患者数は、近年数10人/年に減少しているが、毎夏ブタ血清の抗体陽性率は多くの都府県で50%を越え(日本脳炎ウイルス汚染地区とされる)、なおワクチン接種は必要と思われる。

(福永利彦)

E. オルトミクソウイルスと感染症

ミクソウイルスは、細胞表面のシアル酸を含む特定の複合糖鎖をレセプターとして認識し、それと特異的に結合する。加えて、その糖鎖を切断遊離させる酵素活性をも合わせもつ。すなわち、粘液物質myxoに親和性を示す特性がある。ウィルスの生物学的性状の相違から、A型、B型、C型インフルエンザウイルスをオルトミクソウイルス科Orthomyxoviridaeに、ムンブスウイルス、麻疹ウイルス、RSウイルスなどをパラミクソウイルス科Paramyxoviridaeに分類する。

オルトミクソウイルス科には、インフルエンザウイルス属genus influenza virusのみが分類される。

1. インフルエンザウイルスの性状

1) ウィルス粒子構造

インフルエンザウイルスゲノムは、10種類(C型は8種類)のタンパク質をコードしている(表8-5、図8-7)。ウイルスゲノムRNAは、基本的に各遺伝子単位ごとに分節し、第1分節から第8分節(C型は第7分節)まで1組となってウイルス粒子を構成する。第7、第8分節RNAから転写されるmRNAには、長いmRNAとスプライシングを受けた短いmRNAとがあり、それらから異なるタンパク質が翻訳される。ゲノムRNAはマイナス極性、1本鎖、線状、全分子量 $4 \sim 5 \times 10^6$ ダルトン、全塩基総数 $13 \sim 15 \times 10^9$ 塩基で各型のプロトタイプウイルスについては、その全塩基配列も決定されている。

ウイルスRNAには、核タンパク質nucleoprotein(NP)が、らせん対称状に配列し、それに3種類のRNA依存性RNAポリメラーゼ(PB2, PB1, PA)が結合してヌクレオカプシドnucleo-

本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。
取扱にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

I. RNA型ウイルス 461

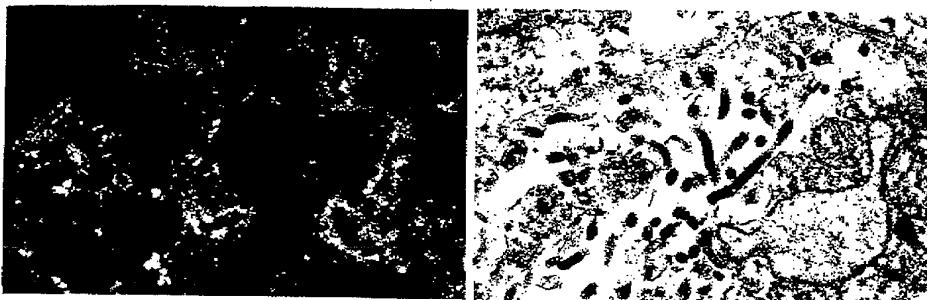


図 8-30 エボラウイルス粒子(マウス)
エボラウイルス感染腎のウイルス抗原(左)とウイルス粒子(右)

業中の200余名の兵士が重篤出血熱に罹患した。このときの分離ウイルスが、1956年アフリカのコンゴでの分離ウイルスと同一のものであることが判り、CCHF virusと名づけられた。自然界には家畜(ヤギ、ヒツジ、仔ウシ)や野生の哺乳類に存在し、マダニがヒトへウイルスを媒介する。ウイルスは、ブニヤウイルス科 Bunyaviridae のナairoウイルス Nairovirus 属のメンバーである。分布域はアフリカ一帯、中近東、中央アジア、インド亜大熱、東欧、中国西部と広範である。

ヒトからヒトへの感染は血液による。院内感染例はいくつも知られている。ビニール手袋1枚で防げたものが大部分である。潜伏期間は2~9日である。症状は他の3疾患同様非特異的である。重症化すると、広範に皮下出血(真黒になる)を生ずる。とくに消化管出血が激しく、死に至る。異常白血球、血小板減少が著明である。予後は悪い。

特異的治療法はない。予防ワクチンもない。

5. ハンタウイルス感染症

ハンタウイルス属は、この10年来注目されてきたもので、ブニヤウイルス科 Bunyaviridae の主要メンバーである。このウイルスの自然界の宿主は野ネズミである。古くから知られている疾患の

腎症候性出血熱 hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) と、1993年以来米国でみられたハンタウイルス肺症候群 Hantavirus pulmonary syndrome (HPS) の病原体である。ネズミが常時持続感染状態にあることから、人畜共通感染症の一つである。

a. ウィルスの性状

物理化学的刺激に弱く、多形性を示す。直径90~115 nm の粒状で膜を有する(図8-31)。分子量には多少の差はあるが、4種のポリペプチドからなり、それぞれ分子量は45, 50 kD(ヌクレオカプシド), 55~57 kD(糖タンパク), 72~74 kD(糖タンパク), 200 kD(Lタンパク, RNAポリメラーゼ)である。抗原性、病原性と疾患との関連性から5群のサブタイプに分かれる(図8-32)。ハンタウイルスは、マイナス鎖RNAをもち、L, M, Sの3分節遺伝子を有する。

b. 歴史的背景と疫学(図8-33, 表8-21)

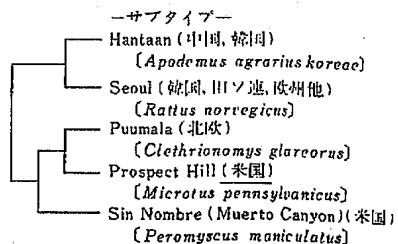
HFRSは古くは中国で10世紀より、近代では1930年代より疾患として注目されている。朝鮮半島から中国にかけては高熱、タンパク尿、出血傾向を伴う重症アジア型が一般的で、しばしば腎不全に陥る。戦前は、満州東北地方での旧日本陸軍兵士間での流行性出血熱 epidemic hemorrhagic fever (EHF) の集団発生が注目された。朝鮮半島では、1950年代前半に国連軍兵士2,000余人に不

本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。
取扱にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

462 第8章 ウィルス学各論

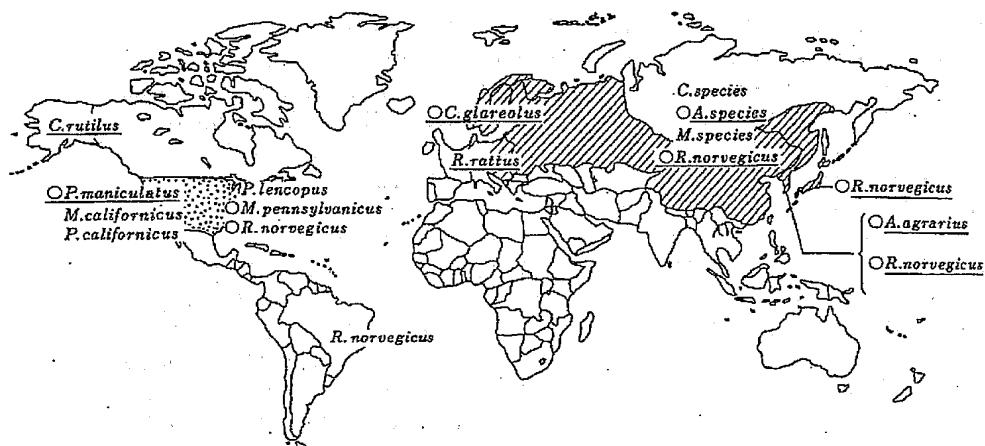


図 8-31 HFRS ウィルス粒子



() : 疾患分布地域, (—) : 疾患との関連はない, (○) : 自然界の宿主

図 8-32 ハンタウイルスグループ



患者発生のある地域: HFRS (斜線), HPS (点線); A: Apodemus, M: Microtus, C: Clethrionomys, R: Rattus, P: Peromyscus; ○: ウィルス分離(+), —: ヒトの疾患に関連

図 8-33 HFRS と HPS の分布 (ネズミと患者)

明熱患者が発生し、臨床症状と剖検所見から、EHF と同様であることがわかった。韓国型出血熱 Korean hemorrhagic fever (KHF) と名づけられた。わが国では、1960 年からの 10 年余に、大阪梅田で一般市民間に 119 名の患者発生が知られる。最も注目されたのは、1980 年代初めから数年間に、医学生物学実験室で、ラットの飼育・実験中に多数の感染者・患者が発生したことである。HFRS 関連ウイルスは、1978 年に初めて Lee ら

により分離された。

米国の HPS は、1992 年秋から 1996 年 1 月までに 24 州で 127 名の発生があり、49 名が死亡している。最初はニューメキシコ、アリゾナを中心としたいわゆる four corners 地域でみられたが、その後米全土に分布していることがわかつてきた。米国インディアンの居留地の Navajo 地区および、一般白人でも木造家屋の居住者にみられるので、人種は無関係である。図 8-32 のように、シ

本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。
取扱にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

I. RNA型ウイルス 463

表 8-21 ハンタウイルス感染症の特徴

Hanta 亜型	HFRS			HPS
	Hantaan	Seoul	Puumala	Sin Nombre
地理分布	アジア	世界中	北欧	米国
自然宿主	アポデムス (高麗セジネズミ)	ドブネズミ	ヤチネズミ	シカシロアシネズミ
発症病理	腎性(中・重症)	腎性(中・重症)	腎性(軽症)	肺(重症)
死亡率	5~15%	1%	<0.1%	40%
疾患名	流行性出血熱 韓国型出血熱	流行性出血熱 腎症候性出血熱	nephropathia epidemica	ハンタウイルス 肺症候群

カシロアシネズミが主として媒介する。ヒトでの主な標的は肺である。

ヒトへの感染は尿の含まれた床敷、ほこりなどのエアロゾル、あるいは咬まれるなどにより成立する。ヒトからヒトへの感染はない。

c. HFRS と HPS の臨床症状・診断・治療
HFRS ウィルスは、ヒトに感染すると重篤な全身感染あるいは腎疾患(腎不全)をもたらす。重症アジア型では、潜伏期は10~30日で、発症すると①有熱期、②低血圧ショック期(4~10日)、③乏尿期(8~13日)、④利尿期(10~28日)、⑤回復期の経過をとる。血中尿素窒素は50~300mgに達する。高度のタンパク尿、血尿がずっとみられる。北欧型では軽度の発熱、タンパク尿、血尿がみられるのみである。

これに対し HPS では、発熱、悪寒、筋肉痛などの症状が数日続き、急速に呼吸困難が進行し、酸素不飽和状態に陥る。

診断は、ELISA 法や免疫蛍光法による抗体上昇の検索(IgM, IgG)、PCR 法によるウイルスゲノムの検出などが用いられている。治療法は対症療法以外にはない。予防法としてのワクチンもない。

d. ハンタウイルス感染の病理像

北欧軽症型では、生検で腎臓質の毛細血管内皮に HFRS 関連ウイルス抗原が検出されている。ア

ジア型重症死亡例では、脳下垂体前葉、腎臓質、副腎、脳、肺、脾、右心耳内膜などに出血壞死がみられる。毛細血管の断裂、小血管拡張、うっ血が全組織に目立つ。腎腫大は顕著で、間質は浮腫状で、糸球体では血管内皮増生がある。皮膚から臓質域にかけて、うっ血性変化は必発である。HFRS ウィルス抗原は、上記諸臓器の毛細、小血管内皮細胞に主として検出された。

HPS では、CDC へ集められた49例の剖検例でみると胸腔滲出液があり、肺は高度に浮腫(水腫)様である。腎に著しい変化をみない。HPS ウィルス抗原は、肺胞中隔や脾臓の毛細血管内皮細胞に検出されている。

e. ネズミにおけるハンタウイルス感染病理像

① HFRS 関連ウイルス感染：野ネズミも実験室内感染ラットも基本的には同様で、動脈から毛細血管、静脈に至る血管系内皮細胞、脳脊髄・神経系では感染は必発といってよい。ラット由来ウイルスはラットに、マウス由来ウイルスはマウスに対してより強い病原性を示す。

② HPS 関連ウイルス感染：ヒトと同様の所見はないが、ウイルス抗原は、肺や脾臓の毛細血管内皮細胞に認められるが、HFRS によるような激しい破壊像はない。どちらのウイルスも、動物では血管内皮細胞で持続感染状態になる。

(倉田 敏)

本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したもので、
取扱にあたっては、著作権侵害とならないよう十分にご注意ください。

歴代執筆者(五十音順)

緒方 幸雄	小澤 敦	栗村 敬	小林 彰男	茂田 士郎
神中 寛	須藤 恒久	高添 一郎	高田 季久	螺良 英郎
中野 昌康	中村 昌弘	橋爪 壮	浜田 忠弥	松田 守弘
南谷 幹夫	三輪谷俊夫	森 龍男	横田 健	吉倉 廣



標準微生物学

発行 1981年4月1日 第1版第1刷
 1982年12月1日 第1版第2刷
 1984年4月15日 第2版第1刷
 1985年9月1日 第2版第3刷
 1987年4月1日 第3版第1刷
 1989年6月1日 第3版第4刷
 1990年3月15日 第4版第1刷
 1991年6月15日 第4版第2刷
 1993年4月1日 第5版第1刷
 1995年3月1日 第5版第4刷
 1996年5月1日 第6版第1刷◎
 1997年12月1日 第6版第2刷

監修 川名林治

発行者 株式会社 医学書院

代表取締役 金原 優

〒113-91 東京都文京区本郷5-24-3

電話 03-3817-5600 (社内案内)

印刷 三美印刷

製本 長野製本

用紙 三菱製紙

本書の内容を無断で複写・複製・転載すると、著作権・出版権の
侵害となることがありますので御注意下さい。

ISBN 4-260-10445-4 Y6400

■<日本複写権センター委託出版物・特別扱い>

本書の無断複写は著作権法上での例外を除き、禁じられています。
 本書は日本複写権センターへの特別委託出版物です。複写される場合、そのつど事前に日本複写権センター（電話 03-3401-2382）の
許諾を得てください。

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 713 877 A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:

29.05.1996 Bulletin 1996/22

(51) Int. Cl.⁶: C07D 493/18

(21) Application number: 94921568.5

(86) International application number:
PCT/CN94/00056

(22) Date of filing: 19.07.1994

(87) International publication number:
WO 95/03311 (02.02.1995 Gazette 1995/06)

(84) Designated Contracting States:

AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI NL PT SE

(30) Priority: 19.07.1993 CN 93108651

(72) Inventors:

- LUO, Xuande
Beijing 100020 (CN)
- Li, Zelin
Dongzhimennei, Beijing 100700 (CN)
- Zeng, Yi
Xuanwu District, Beijing 100052 (CN)
- Ma, Lin
Chaoyan District, Beijing 100020 (CN)

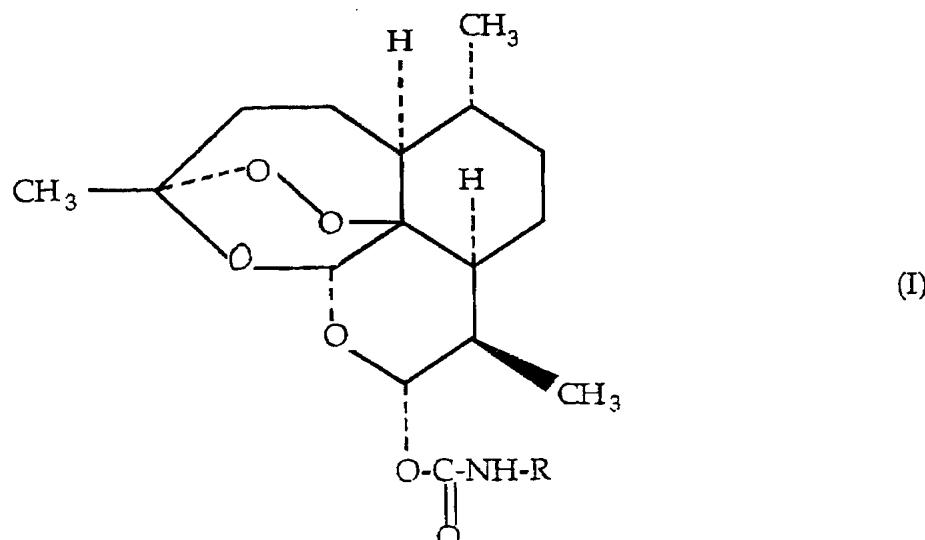
(71) Applicants:

- LUO, Xuande
Beijing 100020 (CN)
- Li, Zelin
Dongzhimennei, Beijing 100700 (CN)
- Zeng, Yi
Xuanwu District, Beijing 100052 (CN)
- Ma, Lin
Chaoyan District, Beijing 100020 (CN)

(74) Representative: Warcoin, Jacques
Cabinet Régimbeau,
26, avenue Kléber
F-75116 Paris (FR)

(54) QINGHAOSU DERIVATIVES AGAINST AIDS

(57) This invention relates to the compounds represented by general formula (I) and the processes for their preparation, wherein R is selected from C₁-C₄ alkyl, C₃-C₆ cycloalkyl, phenyl unsubstituted or substituted by a halogen atom or nitro group, biphenyl unsubstituted by a halogen atom or nitro group, naphthyl unsubstituted or substituted by a halogen atom or nitro group. The compounds of this invention are used to prepare agents for prevention and treatment of AIDS and drugs against malaria and toxoplasmosis.



Description**FIELD OF THE INVENTION**

5 This invention relates to carbocyclic compounds, in particular to artemisinin-type new derivatives, their preparation and use in prevention and treatment of AIDS viruses.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 AIDS is the abbreviation of acquired immunodeficiency syndrome. In 1981, the first case of AIDS was found in the United States of America. In 1983, Professor Montagnier of the Pasteur Institute, France, isolated for the first time a virus from a patient's blood, which was later designated as HIV, thereby this disease, AIDS, was proved to be a viral infectious disease characterized by acquired immunodeficiency. Since HIV is T-lymphocytophilic, on one hand it multiplies and releases continuously in these cells and the released virus again invades new T-lymphocytes ; on the other hand, 15 the T4-lymphocytes invaded by this virus may coalesce with other T4-lymphocytes to form syncytia which are unstable and may die easily. The virus multiplies, releases, forms syncytia and dies repeatedly as such, thereby results in profound cellular immunodeficiency, finally destroys human immune function and leads to death. Besides T-lymphocytes, HIV may also invade macrophages, B-lymphocytes, etc... ; especially it may form chronic infection in macrophages, and may exist for a long time. The development of this disease may be divided into three stages, i.e., HIV-carrier stage, ARC 20 stage and AIDS stage. Once the disease developed to AIDS stage, it progresses rapidly and the 3-year survival rate is less than 10 %. At present, approximately 20,000,000 persons are infected by HIV in the world, the number of AIDS patients reached 600,000 and half of them have already died. China is not an exception. AIDS was imported into China in 1984. At present, 890 persons infected by HIV have been found in China, among them, 740 HIV-carriers and 5 AIDS patients are Chinese. The number of HIV-infected persons is still continuously increasing.

25 With regard to anti-HIV agents, the first one reported was Suramin. In 1985, AZT (3'-azido-3'-deoxythymidine), etc..., were found to possess anti-HIV activity in vitro. Clinical studies were carried out in 1986, and AZT was approved by FDA of the United States of America as the first drug to be used for the treatment of AIDS in 1987. Up to now, several hundred new compounds and their prescriptions including dozens of natural products and traditional Chinese medicine have been screened in the world. Only AZT, DDI (dideoxytrophicardyl) and DDC (dideoxycytidine) are approved by the FDA 30 on the United States of America to be used for the treatment of AIDS ; among natural products and traditional Chinese medicinal herbs, such as trichosanthin is approved by the FDA for clinical observation. But all these drugs have different types of toxicity, for example, 4-6 weeks after the use of AZT, inhibition of bone marrow appears, then severe anemia develops ; 6 months after the use of AZT alone, drug resistance may be produced ; furthermore, AZT does not exert inhibitory effect of the virus within infected macrophages thus it cannot remove the hidden peril, and in addition, its price 35 is high. DDC and DDI produce toxicity to peripheral nerves which appears 6 weeks after drug administration ; higher dosage may result in sequelae which may still be present even one year after discontinuation of the drug. Trichosanthin has produced neurotoxicity in clinical trial, and in severe cases temporary dementia and even coma appeared. Experimental studies showed that treatment of HIV-infected macrophages with trichosanthin produced and released a soluble toxic substance which might exert serious destructive effect to human brain cells.

40 Up to now, experimental studies and evaluation have been carried out with several hundred drugs and their prescriptions, natural products, single traditional Chinese drugs and composite traditional Chinese drugs in the world. Effective components were separated from only very few of them, such as glycyrrhizim and lentinam reported from Japan, and effective component of Viola yedoensis reported from the University of California, U.S.A., etc... Most of the compounds 45 were nucleosides, adenosines or peptide derivatives. Whereas, crude extracts were used in experiments conducted on the majority of these drugs. Up to the world congress of AIDS held in Amsterdam, the Netherlands in 1992, the breakthrough progress in drug research was still no seen.

SUMMARY OF THE INVENTION

50 The object of the present invention is to provide an anti-AIDS agent with low toxicity, low price, and to overcome the shortcomings in the prior art.

Another object of the present invention is to provide a process for preparation of the above-mentioned agent.

Still another object of the present invention is to provide a use of the agent, in particular, the use as an anti-AIDS agent.

55 The object of the invention was attained as such :

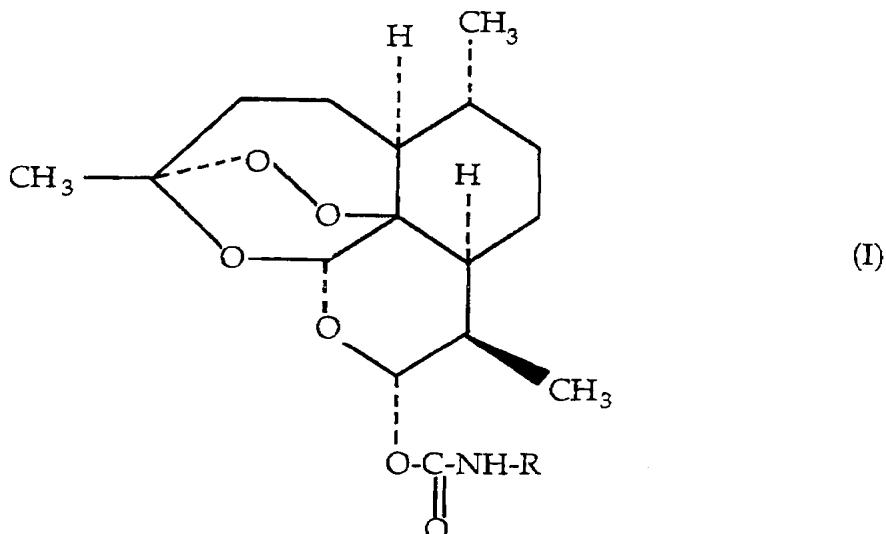
This invention relates to the compounds represented by general formula (I) and their pharmaceutical acceptable salts,

5

10

15

20



25 wherein R is selected from C₁-C₄ alkyl, C₃-C₆ cycloalkyl, phenyl unsubstituted or substituted by a halogen atom or nitrogroup, biphenyl unsubstituted or substituted by a halogen atom or nitro group, naphthyl unsubstituted or substituted by a halogen atom or nitro group.

Among the compounds represented by formula (I), the representative compounds includes:

30 dihydroqinghaosu-methylcarbamate ;

dihydroqinghaosu-ethylcarbamate ;

dihydroqinghaosu-propylcarbamate ;

dihydroqinghaosu-butylcarbamate ;

dihydroqinghaosu-cyclohexylcarbamate ;

dihydroqinghaosu-benzenecarbamate ;

35 dihydroqinghaosu-*m*-chlorobenzene carbamate ;

dihydroqinghaosu-*p*-chlorobenzene carbamate ;

dihydroqinghaosu-*p*-bromobenzene carbamate ;

dihydroqinghaosu-*p*-nitrobenzene carbamate ;

dihydroqinghaosu-*p*-biphenylcarbamate ;

40 dihydroqinghaosu-*l*-naphthylcarbamate.

The present invention also relates to a process for preparation of the compounds represented by general formula (I), comprising following steps :

adding isocyanates into dihydroqinghaosu dissolved in dichloromethane, with the molar ratio (mol/mol) of dihydroqinghaosu to isocyanate being 1:1 to 1:2, to obtain a reaction solution ;

45 refluxing the reaction solution for 1-3 days with stirring ;

filtering and evaporating the reaction solution to obtain a solid product ;

chromatographing the solid product on silica gel column by using a mixture of petroleumether and ethylacetate with a volume ratio of petroleumether to ethyl acetate being 5:5 - 9:1 ;

collecting the required fraction, removing solvant and obtaining crystals.

50 In the above process, said isocyanates includes : alkylcarbamate, benzenecarbamate, cyclohexylcarbamate, biphenylcarbamate and naphthylcarbamate.

The present invention also relates to a composition comprising said compound, uses of said compound for preparing agents for prevention and treatment of AIDS, anti-malarial and anti-toxoplasma.

The present invention has following advantages :

- 55 1. Compounds according to the present invention have a higher inhibition and killing effect to HIV virus with low toxicity to both animal and human being.

2. Compounds according to the present invention not only have effect on HIV in T-lymphocytes but also have obvious effect on HIV in macrophages.

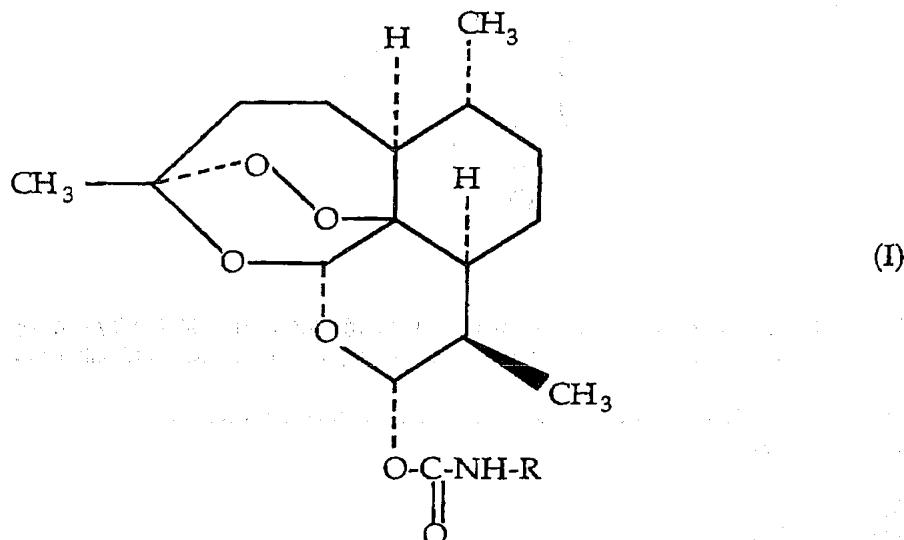
In other words, a traditional Chinese herb, Artemisia annua L., with abundant resources in China was used in the present invention. Qinghaosu (Artemisinin) was extracted from Artemisia annua L. A breakthrough progress has been made in the anti-HIV effect of its serial derivatives, thereby the objects of the invention was accomplished.

Following is a detail description to the present invention.

Qinghaosu (Artemisinin), extrated from Artemisia annua L. firstly in China, is a noval anti-malarial agent which is a sesquiterpene lactone comprising a peroxide bridge. Various of its derivatives are all derivated from dihydroqinghaosu.

Following is a detail description of the present invention.

This invention relates to the compounds represented by general formula (I) and their pharmaceutical acceptable salt,



wherein R is selected from C₁-C₄ alkyl, C₃-C₆ cycloalkyl, phenyl unsubstituted or substituted by a halogen atom or nitro group, biphenyl unsubstituted or substituted by a halogen atom or nitro group, naphthyl unsubstituted or substituted by a halogen atom or nitro group.

A process for preparation of the compounds represented by general formula (I) employed in the present invention comprising following steps:
 adding isocyanates into dihydroqinghaosu dissolved in dichloromethane, with the molar ratio (mol/mol) of dihydroqinghaosu to isocyanates being 1:1 to 1:2, to obtain a reaction solution ;
 refluxing the reaction solutio for 1-3 days with stirring ;
 filting and evaporating the reaction solution to obtain a solid product ;
 chromatographing the solid product on silica gel column by using a mixture of petroleumether and ethyl acetage with a volume ratio of petroleumether to ethylacetate being 5:5 - 9:1 ;
 collecting the required fraction, removing solvant and obtaining crystals.

In the above process, sand isocyanates includes:

alkylcarbamate,
 benzene carbamate,
 cyclohexylcarbamate,
 biphenylcarbamate and
 naphthylcarbamate.

Thus, compounds and its pharmaceutical acceptable salt can be prepared. These compounds includes :
 dihydroqinghaosu-methylcarbamate ;
 dihydroqinghaosu-ethylcarbamate ;
 dihydroqinghaosu-propylcarbamate ;
 dihydroqinghaosu-butylcarbamate ;
 dihydroqinghaosu-cyclohexylcarbamate ;

dihydroqinghaosu-benzenecarbamate ;
dihydroqinghaosu-*m*-chlonobenzenecarbamate ;
dihydroqinghaosu-*p*-chlonobenzenecarbamate ;
dihydroqinghaosu-*p*-bromobenzene carbamate ;
5 dihydroqinghaosu-*p*-nitrobenzenecarbamate ;
dihydroqinghaosu-*p*-biphenylcarbamate ;
dihydroqinghaosu-*I*-naphthylcarbamate.

In the process, dichloromethane, whose concentration is well-known in the art, such as 99.0 %, can be employed to dissolved dihydroqinghaosu.

10 Above compounds can be used as a drug alone or in a pharmaceutical composition. In the composition, it contains 0.1 - 99.5 %, preferably, 0.5 - 90 % of the compound, and other pharmaceutical acceptable inactive carriers with low toxicity to human and animal.

15 Said carriers are one or several kind of diluent, filler or adjuvant in solid, semisolid or liquid form, it is suggested that the dosage in the pharmaceutical composition to be administrated is measured by per kilogram of body weight. The compounds of the present invention can be used by intravenous, bonemarrow, rectal, oral, intramuscular or hypodermic administration, oral administration is preferred.

The oral preparation are in solid or liquid form such as powder, tablet, capsule, granule, suspension, drops, syrup and preparation for hypo-tongue administration.

20 The dosage of the compounds of the present invention is according to the situation of patient (age and body weight), route of administration, type of disease and stage of disease and so on. Usually, the effective dose of these compounds is 0.5 - 1.5 mg, preferably, 0.6 - 1 mg per day.

THE BEST MODE TO CARRY OUT THE INVENTION

25 The pharmacologic and toxicologic studies of the compounds according to the present invention were illustrated as following.

EXPERIMENT 1. ANTI-HIV EXPERIMENT

30 A. EFFECT ON MT4 CELLS

1. MATERIAL

35 The virus used was HIV-1 which had been obtained from Professor Montagnier of the Pasteur Institute, France. The virus titer used in the experiment was 1×10^4 TCID₅₀/ml. The cell culture used was CEM cell line which was cultivated in the HIV laboratory of Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, for cultivation storage of HIV-1.

40 The compounds used in the experiment were qinghaosu, dihydroqinghaosu, Artesunate, Artemether, dihydroqinghaosu-methylcarbamate, dihydroqinghaosu-benzenecarbamate, qinghaosu-morpholinyl propylether maleate, dihydroqinghaosu-diethyl amino ethyl ether maleate, deoxyqinghaosu-morpholinyl ethyl ether maleate, qinghaosumorpholinyl propanol ether maleate, qinghaosu-3,5-dimonpholinyl methyl-4-hydroxy benzyl ether maleate, dihydroqinghaosu-*m*-chlorobenzoate, ginghaosu-3-pyrrolidinylmethyl-4-hydroxybenzoate oxalate, and qinghaosu-3-morpholinylmethyl-4-hydroxybenzoate oxalate AZT was used as a positive control. The concentration of the original solution of these compounds were all 1 mg/ml.

45 2. METHOD

a. Freshly cultured MT4 cells (5×10^5 /ml) were cocultivated with the virus fluid (10^3 TCID₅₀/ml) in a CO₂ incubator at 37°C for 1-1.5 hours. RPMI 1640 complete medium (containing 10 % Bovine serum and antibiotics, such as penicillin) was used to wash the unbound virus. Complete medium was added to correct the concentration for use.

50 The experiment was carried out on the plates with 96 wells. 0.1 ml of the above-mentioned infected MT4 cell suspension was added into each well, and then 0.1 ml of various concentrations of the drugs were added. A control group with AZT as a positive drug and a virus control without drug (with only virus-infected MT4 cells) were set up. Each concentration of the drugs was added into two wells. Both the experiment group and the control group were incubated in a CO₂ incubator at 37°C. The drug solution were changed 3 days later, and the following observations 55 were carried out 6 days afterwards.

b. Observation on the growth situation of cells. Trypan blue dye was used to observe the quantity of live cells in each group.

c. Determination of the virus antigen expression. The immunoenzymatic method was used to examine the virus antigen expression. Cells from each group were separately smeared in two wells. They were fixed with cold acetone, HIV-positive serum was dropped into the wells. After incubated in a CO₂ incubator at 37°C for 30 minutes, they were washed with PBS for 3 times. Enzyme-labelled SPA was dropped into the wells. They were incubated in the same condition for 30 minutes, washed with PBS for 3 times, and then put in substrate solution to stain for 2-3 minutes, washed with distilled water, and observed under microscope. Normal cells were colorless, whereas virus-carrying cells appeared brownish red.

3. EVALUATION ON RESULT

The virus control group on the smear showed many distinct brownish red cells. The AZT 1 × 10⁻¹, 1 × 10⁻², 1 × 10⁻³ group showed entirely no pink cells, indicating that the method used was reliable. The mark used were as follows :

- "-" indicates that positive cells were not seen in the whole well ;
- "±" indicates that there were only 1-2 doubtful positive cells in the whole well ;
- "+" indicates that there were 2-3 or more positive cells in the whole well.

The experiment was repeated two to three times.

The concentration of the original fluid of these compounds were all 1 mg/ml. 0.1 ml was taken and added into 0.1 ml of virus-carrying cell suspension, thus the reaction concentrations were as follows : in the original fluid group, 0.1/0.2 ml, i.e., 0.5 mg/ml ; in 1 × 10⁻¹ group, 0.05 mg/ml ; in 1 × 10⁻² group, 0.005 mg/ml ; in 1 × 10⁻³ group, 0.0005 mg/ml, i.e., 0.5 µg/ml; and on the analogy of this.

After the reaction, the supernatant was collected and the reaction mixture was centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes.

30

35

40

45

50

55

T A B L E 1

5

COMPARISON OF THE EFFECT OOF HIV-1 (MT₄) OF
THE SEVERAL COMPOUNDS

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Compound	Concentration	1×10^{-1} (50 μ g/ml)	1×10^{-2} (5 μ g/ml)	1×10^{-3} (0.5 μ g/ml)	1×10^{-4} (0.05 μ g/ml)
Qinghaosu	-	-	-	+	+
Dihydroqinghaosu	-	-	-	\pm	+
Artesunate	-	-	-	-	+
Artemeter	-	-	-	\pm	+
Dihydro-qinghaosu-methyl-carbamate	-	-	-	-	-
Dihydro-qinghaosu-benzene-carbamate	-	-	-	-	\pm
AZT	-	-	-	-	/
Qinghaosu-morpholinylpropyl ether maleate	-	+	-	+	
Dihydroqinghaosu-diethyl-amino ethyl ether maleate	\pm	+	-	+	
Deoxyqinghaosu-morpholinyl propanol	-	+	-	-	
Qinghaosu-morpholinyl propanol ether maleate	+	+	-	+	
Qinghaosu-3,5-dimorpholinyl methyl-4-hydroxy benzyl ether maleate	+	+	-	+	
Dihydroqinghaosu-m-chlorobenzoate	-	-	-	+	

5 Qinghaosu-3-pyrrolidinylmethyl-4-hydroxy benzoate oxalate	-	+	-	
10 Qinghaosu-3-morpholinyl methyl-4-hydroxy benzoate oxalate	±	+	+	

15 According to Table 1, representative compounds, dihydroqinghaosu-methylcarbamate and dihydroqinghaosu-benzene carbamate showed distinct inhibition on HIV.

B. EFFECT ON U937 CELLS

20 Furthermore, a part of the compounds according to the present invention were used to test their inhibition effect on U937 cell line (macrophage cell line) according to the methods in Experiment 1. Then HIV-antigen and reverse transcriptase in cells were tested ; results were shown in Table 2.

25 TABLE 2

INHIBITION EFFECT ON U937 ON A PART OF THE COMPOUNDS OF THE PRESENT INVENTION			
Compound and dosage	Cell line and virus	Antigen test (IE)	Activity of reverse transcription (CPM)
Artesunate (50 µg/ml)	U937 HIV-1	-	- (4846)
AZT (1 µg/ml)	U937 HIV-1	+	+ (10865)
Control	U937 HIV-1	+	+ (24502)
Dihydroqinghaosu-benzene carbamate (50 µg/ml)	U937 HIV-1	-	- (2305)
Dihydroqinghaosu-methylcarbamate (50 µg/ml)	U937 HIV-1	-	- (4463)
Control	U937 HIV-1	+	+ (24502)

40 From Table 2, it is obvious that the compounds according to the present invention showed distinct inhibition on U937 infected HIV-1, whereas AZT does not show the inhibition.

45 **EXPERIMENT 2. ANTIMALARIA EFFECT**

EFFECT ON ERYTHROCYtic STAGE OF PLASMODIUM BERGHEI

50 1. "Four day inhibition test" in mice.

To determinate the SD₅₀ with Peters' "four day inhibition test".

Hybrid Kunming strain mice body weight 18.22 g, were inoculated with 1 x 10⁷ Parasite infected RBC intraperitoneally on D₀. Dihydroqinghaosu-methylcarbamate, dihydroqinghaosu-butylcarbamate, dihydroqinghaosu-benzene carbamate and dihydroqinghaosu-4-nitrobenzenecarbamate with different concentration were given once a day from D₀-D₃. Blood smears from mouse's tail were made on D₄, stained with Gimsa reagent and examined under microscope to count the infected and uninfected erythrocyte to get infected rate. Inhibitory rates of different dosages were calculated by following formula. The SD₅₀ was calculated by the simplified probit analysis:

$$\text{Inhibitory rate} = \frac{\text{Infected rate of RBC in control group} - \text{Infected rate of RBC in drug treat group}}{\text{Infected rate of RBC in control group}} \times 100$$

5 Results is following :

TABLE 3

Compounds	SD ₅₀ (mg/kg/day)
Dihydroqinghaosu-methylcarbamate	0.24
Dihydroqinghaosu-butylcarbamate	0.25
Dihydroqinghaosu-benzene carbamate	0.29
Dihydroqinghaosu-4-nitrobenzenecarbamate	0.30

20 EXPERIMENT 3. ANTITOXOPLAMA EFFECT

In vitro incubation was used in the experiment. Macrophages were taken from intraperitoneal of the uninfected BALB/C mice (obtained from Universite Pierre et Marie Curie), centrifuged, washed and counted. Around 1.28×10^5 cells was added into each culture dish, incubated at 37°C for 3 hours to let the cells to be adherent, then infected by parasites (Toxoplasma Gondii, obtained from Université Pierre et Marie Curie), ion which parasite number was 1×10^6 , so that there were 5 organisms per macrophage. The dishes were incubated at 37°C for 48 hours, different concentration, (i.e., 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml) of the compound according to the present invention was added in. In a control group, no drug was added in. After being cultured at 37°C for 48 hours, dishes of compound treated groups and control group were colorized. Under microscope, the number of infected and uninfected macrophages in each dishes were counted and to calculate infected rate of macrophage and to count the number of parasites in 100 macrophages. Result showed that dihydroqinghaosu-methylcarbamate had obvious inhibition of Toxoplasma Gondii *in vitro*.

TABLE 4

EFFECT OF DIHYDROQINGHAOSU-METHYLCARBAMATE ON TOXOPLASMA GENDEI <i>IN VITRO</i>				
Dosage (µg/ml)	Infected rate of macrophages	Inhibition rate (%)	No. of parasites in 100 macrophages	Inhibition rate (%)
50	0.67	99.1	2.67	99.5
100	0	100	0	100
200	0	100	0	100
Control	75.60		544.00	

45

EXPERIMENT 4

50 TOXICOLOGIC STUDY OF THE COMPOUNDS OF THE PRESENT INVENTION

ACUTE TOXICITY IN MICE

Animals : Hybrid swiss strain mice (provided by Animal House of Institute of Chinese Medicine, China Academy of Traditional Chinese Medicine), 20 - 22 grams, less than 6 weeks age of both sexes fed in laboratory for 3-5 days observation and a random taking food and drinking.

Drugs : Dihydroqinghaosu-methylcarbamate and dihydroqinghaosu-benzene carbamate.

Above two drugs in powder form were dissolved into peanut oil. The biggest dose were 2000 mg/kg and 2161 mg/kg respectively. The distance between two dose groups were 0.7 and 0.68 respectively, with 5 dose groups each drugs.

Method : The mice were given single dose of above compound respectively intragastrically, the acute intoxication manifestations were observed the LD value (LD₅, LD₅₀ and LD₉₅) and B value were determined by three days mortality.

Result : The symptoms and signs of acute intoxication were observed as following : inhibited activity, bad appetite, hair looseness, cardiac rate decreased than died. In large dose group, all mice died within three days, the LD and B value were 1065.89 mg/kg and 1120.84 mg/kg respectively. See Tables 5 and 6 for detail.

Also, toxicity of compounds similar to the compound of the present invention was lower than that of Artemether, dihydroqinghaosu and Artesunate. See Table 7 for detail.

10

TABLE 5

DEATH DISTRIBUTION OF MICE					
	Drugs	Dosage (mg/kg)	Female exp./death	Male exp./death	female+ male exp./death
15	Dihydroqinghaosu-benzenecarbamate	2000	5/6	6/6	12/12
		1400	6/4	6/3	12/7
		980	6/2	6/2	12/4
		686	6/1	6/2	12/3
		480	6/0	6/1	12/1
20	Dihydroqinghaosu-methylcarbamate	2161	5/5	5/5	10/10
		1470	5/2	5/3	10/5
		100	5/2	5/2	10/4
		680	5/2	5/1	10/2
		462	5/0	5/1	10/1

30

TABLE 6

ACUTE TOXICITY IN MICE (LDF) AND SLOPE (B)						
	Drugs	Sex	LD ₅	LD ₅₀	LD ₉₅	B
35	Dihydroqinghaosu-benzenecarbamate	F	603.91	1097.23	1993.51	6.843
		F	352.10	1039.73	3069.59	3.498
		F+M	463.33	1065.89	2452.08	4.546
40	Dihydroqinghaosu-methylcarbamate	F	343.17	1213.64	2711.67	4.711
		M	360.92	1028.85	2932.84	3.620
		F+M	435.73	1120.84	2853.02	4.01
45						

50

TABLE 7

COMPARAISON OF LD ₅₀ OF SEVERAL SIMILAR COMPOUNDS		
Drug	LD ₅₀ (mg/kg)	Remarks*
Artemether	263	I.M.
Artesunate	769	I.V.
Dihydroqinghaosu	765	P.O.
Dihydroqinghaosu-benzenecarbamate	1065	P.O.
Dihydroqinghaosu-methylcarbamate	1120	P.O.

*: Table 7,

I.M. : Intramuscular injection ;

I.V. : Intravenous injection ; and

P.O. : per os.

Subacute toxicology study showed that basic safe dosages of dihydroqinghaosu-benzenecarbamate and dihydroqinghaosu-methylcarbamate were 54 mg/kg/day and 30.2 mg/kg/day respectively.

Followings are general explanation of examples.

Melting points were taken on a Fisher-Johns melting point apparatus. Silica gel 60 (230-400 mesh ASTM) from Merck was used for column (Aldrich Chemical Co.). Optical rotations were measured with Perkin-Elmer-241-MC polarimeter in CHCl₃. UV spectra were measured in CHCl₃ with a Hewlett-Packard-8450-A spectrophotometer, λ_{max} (log ε) in nm. IR spectra (in cm⁻¹) were obtained on a Beckman-4230 instrument as KBr tablet or CHCl₃ solution between NaCl plates. Chemical ionization (CI) mass spectra (m/z) were obtained by using a Finnigan-1015D spectrometer. ¹H-NMR spectra were determined by using JEOL-FX-100 spectrometer and a Nicolet-500 spectrometer with Me₄Si as an internal reference (δ in ppm, J in Hz). Fraction of column chromatography was detected by thin layer chromatograph. And this layer chromatography were performed on silica gel GF plate (10 x 20 cm) from Analtech, Inc., with petroleum ether/AcOEt ; detection with iodine vapors.

EXAMPLE 1

PREPARATION OF DIHYDROQINGHAOSU-METHYLCARBAMATE

A solution of dihydroqinghaosu (284 mg, 1 mmol) in dry CH₂Cl₂ (6 ml) and methyl isocyanate (63 mg, 1.1 mmol) was refluxed for ca. 2 days. The solution was filtered and evaporated in vacuo at 40°C to give a solid, which was chromatographed on a silica-gel column with petroleumether/AcOEt 8:2. The fraction obtained was evaporated to give a white powder (217.6 mg).

m.p. 175-177°C ; MS (Cl, NH₃) : 342 (M⁺ + 1) ;

¹H NMR (CDCl₃)δ(ppm)

5.50 (s, 1H, C₅-H)

5.77 (d, 1H, C₁₂-H)

2.65 (m, 1H, C₁₁-H)

Anal. Calc. for C ₁₇ H ₂₇ NO ₆ 1/2 H ₂ O:			
	C 58.27	H 8.05	N 4.00
found	C 58.48	H 8.09	N 4.08

EXAMPLE 2PREPARATION OF DIHYDROQINGHAOSU BENZENECARBAMATE

5 A solution of dihydroqinghaosu (142 mg, 0.5 mmole) in dry CH_2Cl_2 (6 ml) and phenyl isocyanate (60 mg, 0.5 mmol) was refluxed for ca. 2 days. The solution was filtered *in vacuo* at 40°C to give an oil, which was chromatographed on a silica-gel column with petroleum ether/AcOEt 9:1. After evaporation of the solution, the white powder was recrystallised from (i-Pr)₂O to afford dihydroqinghaosu-benzene carbamate (167 mg).

m.p. 110-113°C ; $[\alpha]^{22}\text{D} = + 11.78^\circ$ (C = 0.85, CHCl_3) ;

10 UV. 250 (4.40) ;

IR (KBr) : 3315 (NH), 2932, 2875, 1738 (carbamate), 870, 845, 820 (peroxide), 742, 684 (aromatics)

15 ¹H NMR (CDCl_3) δ (ppm)

5.49 (s, 1H, C₅-H)

5.78 (d, 1H, J = 6.3, C₁₂-H)

2.36 (m, 1H, C₁₁-H)

MS (Cl, NH₃), 404 (M⁺ + 1)

20

Anal. Calc. for $c_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_6$:			
	C 65.49	H 7.24	N 3.47
found	C 65.34	H 7.85	N 3.39

25

EXAMPLE 3PREPARATION OF DIHYDROQINGHAOSU-*p*-NITROBENZENECARBAMATE

A solution of dihydroqinghaosu (142 mg, 0.5 mmole) in dry CH_2Cl_2 (10 ml) was reacted with *p*-nitrophenyl isocyanate (123 mg, 0.75 mmol). Chromatography on silica gel with petroleum ether/AcOEt 9:1 afforded title compound (120 mg) as a white powder.

35 $[\alpha]^{22}\text{D} = + 5.31^\circ$ (C = 1.4, CHCl_3) ;

IR (KBr) : 3300 (NH), 2925, 2870, 1742 (carbamate), 1540, 1330 (NO₂), 845 (peroxide), 740, 680 (aromatics) UV. 132 (4.26) ;

1H NMR (CDCl_3) δ (ppm)

5.57 (s, 1H, C₅-H)

5.79 (d, 1H, C₁₂-H)

2.66 (m, 1H, C₁₁-H)

MS (Cl, NH₃), 449 (M⁺ + 1)

EXAMPLE 4PREPARATION OF DIHYDROQINGHAOSU-*m*-NITROBENZENECARBAMATE

The title compound was similarly prepared from dihydroqinghaosu and *m*-nitrophenyl isocyanate as Example 3. m.p. 143-145°C, UV : 242 (4.09).

EXAMPLE 5PREPARATION OF DIHYDROQINGHAOSU-*o*-NITROBENZENECARBAMATE

55 The title compound was similarly prepared from dihydroqinghaosu and *o*-nitrophenyl isocyanate as Example 3. m.p. 157-159°C, UV : 242 (4.06).

INDUSTRIAL APPLICATION

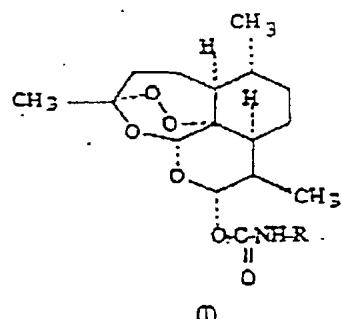
Compounds according to the present invention can be used to prepare agents for prevention and treatment of AIDS and drugs against malaria and toxoplasmosis.

5

Claims

1. A compound represented by general formula (I) and its pharmaceutical acceptable salt,

10



15

20

wherein R is selected from C₁-C₄ alkyl, C₃-C₆ cycloalkyl, phenyl unsubstituted or substituted by a halogen atom or nitro group, biphenyl unsubstituted or substituted by a halogen atom or nitro group, naphthyl unsubstituted or substituted by a halogen atom or nitro group.

- 25
2. Compound according to claim 1, wherein the compound is dihydroqinghaosu-methylcarbamate.
- 30
3. Compound according to claim 1, wherein the compound is dihydroqinghaosu-ethylcarbamate.
4. Compound according to claim 1, wherein the compound dihydroqinghaosu-n-propylcarbamate.
5. Compound according to claim 1, wherein the compound dihydroqinghaosu-n-butylcarbamate.
- 35
6. Compound according to claim 1, wherein the compound dihydroqinghaosu-cyclohexylcarbamate.
7. Compound according to claim 1, wherein the compound dihydroqinghaosu-benzenecarbamate.
- 40
8. Compound according to claim 1, wherein the compound dihydroqinghaosu-3-chlorobenzenecarbamate.
9. Compound according to claim 1, wherein the compound dihydroqinghaosu-4-chlorobenzenecarbamate.
- 45
10. Compound according to claim 1, wherein the compound dihydroqinghaosu-4-bromobenzenecarbamate.
11. Compound according to claim 1, wherein the compound dihydroqinghaosu-4-nitrobenzenecarbamate.
- 50
12. Compound according to claim 1, wherein the compound dihydroqinghaosu-p-biphenylcarbamate.
13. Compound according to claim 1, wherein the compound is dihydroqinghaosu-1-naphthylcarbamate.
- 55
14. A process for preparation of the compounds represented by general formula (I) employed in the present invention comprising following steps:
adding isocyanates into dihydroqinghaosu dissolved in dichloromethane, with the molar ratio (mol/mol) of dihydroqinghaosu to isocyanates being 1:1 to 1:2, to obtain a reaction solution;
reflexing the reaction solution for 1-3 days with stirring;
filtering and evaporating the reaction solution to obtain a solid product;
chromatographing the solid product on silica gel column by using a mixture of petroleumether and ethylacetate

with a volume ratio of petroleumether to ethylacetate being 5:5 - 9:1;
collecting the required fraction, removing solvent and obtaining crystals.

- 5 15. A process according to claim 14, wherein said isocyanates are selected from the group consisting of alkylcarbamate, benzene carbamate, cyclohexylcarbamate, biphenylcarbamate and naphthylcarbamate.
- 10 16. A process according to claim 14, wherein said dichloromethane.
17. A compound prepared by the process according to claim 14.
18. A pharmaceutical composition containing the compound according to claim 1.
19. An application for the compound according to claim 1 in preparation of agents for prevention and treatment of AIDS.
- 15 20. An application for the compound according to claim 1 in preparation of antimalaria agents.
- 20 21. An application for the compound according to claim 1 in preparation of agents against toxoplasmosis.

20

25

30

35

40

45

50

55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN 94/00056

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶ C07D 493/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶ C07D 493/18, 493/20, A61K 31/335, 31/35

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Xuan-de LUO et al, "Configuration of Antimalarials Derived from Qinghaosu; Dihydroqinghaosu, Artemether, and Artesunic Acid", Helv. Chim. Acta, Vol. 67 (1984) P1515—1523	1,7,11, 14—18,20,21
X	US 4,816,478 (Carl R. Thornfeldt) 28 March 1989 (28.03.89)	1—21

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claims(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 24 September 1994 (24.09.94)	Date of mailing of the international search report 20 OCTOBER 1994 (20.10.94)
Name and mailing address of the ISA/ Chinese Patent Office, 6 Xitucheng Rd. Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China	Authorized officer Mu Senchang
Faxsimile No. (86—1)2019451	Telephone No. 2093847

Form PCT/ISA/210(second sheet)(July 1992)

